

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER
FACULTÉ DES SCIENCES

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA SEXUALITÉ
ET DE L'HAPLOÏDIE CHEZ L'ASPERGE CULTIVÉE
(*Asparagus officinalis* L.)

THÈSE

présentée à la Faculté des Sciences de Montpellier
pour obtenir le grade de Docteur-Ingénieur

par

Lucette THEVENIN

Ingénieur agronome, Chargé de Recherches
à l'Institut National de la Recherche Agronomique

soutenue le 24 mai 1967 devant la Commission d'examen

JURY :

M. L. EMBERGER, Professeur, Correspondant de l'Institut	Président
M. Ch. SAUVAGE, Professeur	} Assesseurs
M. A.-M. SICARD, Maître de Conférences	
M. G. VALDEYRON, Professeur à l'I. N. A.	

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER
FACULTÉ DES SCIENCES

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA SEXUALITÉ
ET DE L'HAPLOÏDIE CHEZ L'ASPERGE CULTIVÉE
(*Asparagus officinalis* L.)

THÈSE

présentée à la Faculté des Sciences de Montpellier
pour obtenir le grade de Docteur-Ingénieur

par

Lucette THEVENIN

Ingénieur agronome, Chargé de Recherches
à l'Institut National de la Recherche Agronomique

soutenue le 24 mai 1967 devant la Commission d'examen

JURY :

M. L. EMBERGER, Professeur, Correspondant de l'Institut	Président
M. Ch. SAUVAGE, Professeur	} Assesseurs
M. A.-M. SICARD, Maître de Conférences	
M. G. VALDEYRON, Professeur à l'I. N. A.	



FACULTE DES SCIENCES

DE

MONTPELLIER

LISTE DES PROFESSEURS

Doyen : P. CASADEVALL

Assesseurs : P. DUMONTET

Ch. SAUVAGE

Doyen honoraire : P. MATHIAS

Professeurs honoraires :

R. JACQUES	J. SOULA
M. CASTERAS	G. DENIZOT
E. CARRIERE	J. GRANIER
E. TURRIERE	Ch. BOUHET

Professeurs titulaires :

M.	M. MOUSSERON.....	Chimie Organique
M.	L. EMBERGER.....	Botanique
M.	J. P. ROIG.....	Physique
M.	P. CHATELAIN.....	Minéralogie et Cristallographie
M ^{lle}	O. TUZET.....	Zoologie
M.	G. COUCHET.....	Mécanique Supérieure
M.	J. SALVINIEN.....	Chimie-Physique
M ^{lle}	A. M. VERGNOUX.....	Physique
M.	J. AVIAS.....	Géologie
M.	P. VIELES.....	Chimie
M.	J. RABINOVITCH.....	Physique (C.S.U.P.)
M.	E. KAHANE.....	Chimie Biologique
M.	J.J. MOREAU.....	Mécanique Rationnelle

M.	B. CHARLES.....	Mathématiques Pures
M.	J. MOTTE.....	Biologie Végétale
M.	R. JOUTY.....	Physique
M.	P. DUMONTET.....	Physique
M.	R. LECENDRE.....	Zoologie
M.	I. ASEENMACHER.....	Physiologie Animale
M.	A. CASADEVALL.....	Chimie Organique
M.	B. PISTOULET.....	Physique
M.	Ch. ROUMIEU.....	Analyse Supérieure
M.	J. ROBIN.....	Physique
M.	A. POTIER.....	Chimie Minérale
M.	R. LAFONT.....	Physique
M.	R. JACQUIER.....	Chimie
M.	J. FALGUEIRETTES.....	Minéralogie
M.	J. REGNIER.....	Chimie
Mme	J. CHARLES.....	Mathématiques
M.	P. CAILLON.....	Physique
M.	J. ROUZAUD.....	Chimie
M.	Ch. SAUVAGE.....	Botanique
M.	H. CHRISTOL.....	Chimie (E.N.S.I.)
M.	A. MARTINEAU.....	Mathématiques
Mme	G. VERNET.....	Biologie Animale
M.	L. CECCHI.....	Physique

Professeurs sans chaire :

Mme	M.L. de POUCQUES.....	Botanique (C.S.U.P.)
M.	P. MURACOUR.....	Géophysique appliquée
Mme	M. LAFON.....	Mathématiques
M.	M. MATTAUER.....	Géologie
M.	G. TOURNE.....	Chimie
M.	L. EUZET.....	Zoologie (C.S.U.P.)
M.	J. REMY.....	Géologie
M.	H. ANDRILLAT.....	Astronomie
M.	P. DEMANGEON.....	Géologie
M.	A. BONNET.....	Botanique
M.	M. SAVELLI.....	Physique
M.	G. DELOUPY.....	Physique
Mme	S. ROBIN.....	Physique
M.	L. GRAMBAST.....	Botanique
M.	J. P. LAFON.....	Mathématiques
Mme	Ch. DUBOUL - RAZAVET.....	Géologie (C.S.U.P.)
M.	E. GROUBERT.....	Physique
Mme	H. GUASTALLA.....	Biologie physico-chimique

Maîtres de Conférences :

M.	G. LAMATY.....	Chimie
M.	R. GAUFRES.....	Chimie
M.	F. PROUST.....	Géologie
M.	A. BASSOMPIERE.....	Physique
M.	R. MARTY.....	Psycho-Physiologie
M.	J.J. SOULIER.....	Chimie (C.S.U.P.)
M.	J. PARIS.....	Zoologie
Melle	A. BAILLETTE.....	Mathématiques (C.S.U.P.)
M.	P. MOLINO.....	Mathématiques
M.	N. ROBY.....	Mathématiques (C.S.U.P.)
Mme	PARIS-PIREYRE.....	Physiologie Végétale
M.	G. BOUGNOT.....	Physique
M.	Y. GUITTON.....	Physiologie Végétale (C.S.U.P.)
M.	F. BOMBRE.....	Physique (C.S.U.P.)
M.	C. PUISSEGUR.....	Biologie Animale (C.S.U.P.)
M.	P. VIALLET.....	Chimie (C.S.U.P.)
M.	L. THALER.....	Géologie
	N.....	Mathématiques (M. BOUX)

Chargés d'Enseignements :

M.	M. LEFRANC.....	Mathématiques
M.	A. STURER.....	Mathématiques
M.	J. LEGRAND.....	Physiologie Animale

P R E M I E R E T H E S E

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA SEXUALITE ET DE L'HAPLOÏDIE

CHEZ L'ASPERGE CULTIVEE (*Asparagus officinalis* L.)

SOMMAIRE

	Pages
AVANT-PROPOS	
INTRODUCTION	1
RAPPELS SUR LA SYSTEMATIQUE DU GENRE <u>ASPARAGUS</u>	5
Chapitre I - <u>La sexualité chez Asparagus officinalis L.</u>	9
A. Biologie florale et sexualité	9
B. Déterminisme des formes sexuelles	15
Chapitre II - <u>L'Asperge et les diverses formes de polyembryonie</u>	28
A. Fréquences	29
B. Manifestations et origines	30
C. Haploïdie et polyembryonie	37
D. Compétition entre embryons multiples	39
E. Hérité de l'haploïdie et de la polyembryonie	40
F. Intérêt de la polyembryonie	41
Chapitre III - <u>Recherches sur l'haploïdie chez Asparagus officinalis</u>	43
A. Recherche de graines polyembryoniques	43
B. Recherche d'haploïdes chez les graines polyembryoniques	47
C. Aspects phénotypiques des individus haploïdes	54
D. Aptitude des haploïdes à la reproduction	68
E. Aptitude des haploïdes à la diploïdisation	71
F. Aspects phénotypiques des individus diploïdisés	84
G. Recherche d'haploïdes par d'autres méthodes	93
Chapitre IV - <u>Utilisation des études concernant la sexualité et l'haploïdie chez l'Asperge pour l'amélioration agronomique de l'espèce</u>	105
RESUME ET CONCLUSIONS	111
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	120

AVANT-PROPOS

C'est pour moi un très agréable devoir d'exprimer ma respectueuse gratitude à Monsieur le Professeur EMBERGER, qui a bien voulu accepter le parrainage scientifique de ce travail et la présidence de mon jury de thèse.

Monsieur le Professeur SAUVAGE, Directeur de l'Institut de Botanique, m'a fait l'honneur d'accepter de faire également partie de mon jury et de critiquer mon mémoire ; je l'en remercie très vivement.

Ma gratitude va tout spécialement à Monsieur SICARD, Maître de conférences à la Faculté des Sciences de Toulouse qui a bien voulu juger mon travail et venir jusqu'à Montpellier pour assister à ma soutenance, représentant ainsi, dans mon jury, la génétique universitaire.

Ma très vive reconnaissance va à Monsieur le Professeur VALDEYRON qui avec une inlassable bienveillance, m'a prodigué, tout au long de ma carrière et plus particulièrement à l'occasion de ce travail, ses conseils éclairés, son aide précieuse et ses encouragements.

Je dois aussi exprimer ma très grande gratitude :

- à Monsieur BUSTARRET, Directeur Général de l'Institut National de la Recherche Agronomique et à Monsieur MAYER, Directeur de la Station Centrale de Génétique et d'Amélioration des Plantes, qui m'ont accordé leur confiance et ont mis à ma disposition les moyens nécessaires pour entreprendre et poursuivre mes recherches ;

- à Monsieur BANNEROT, Maître de recherches à l'Institut National de la Recherche Agronomique, responsable du laboratoire des Plantes Potagères, qui m'a confié une tâche passionnante à laquelle il n'a jamais cessé de s'intéresser

- à Messieurs BERNINGER et ESSAD, Maîtres de recherches à l'Institut National de la Recherche Agronomique, dont les conseils amicaux et l'aide précieuse m'ont permis de surmonter bien des difficultés ;

- à mon collaborateur Guy TEJSSEIRE dont l'inlassable dévouement et la parfaite conscience m'ont permis de mener à bien ce travail.

Enfin, il m'est agréable de remercier le personnel technique, administratif et ouvrier du Centre National de Recherches Agronomiques de Versailles, de l'Institut de Botanique de Montpellier et du C.E.P.E. qui, à divers titres, a apporté à la réalisation de ce travail une contribution dévouée et efficace dont j'ai apprécié toute la valeur.

Lorsqu'une espèce est cultivée depuis longtemps, elle subit, au cours des siècles, des séries de modifications dont la plupart sont voulues et réalisées par l'Homme qui s'efforce de modeler l'espèce au gré de ses besoins ou de ses goûts. Ainsi l'intervention humaine transforme peu à peu une population faite d'individus de tailles et d'aspects divers en variétés ou en lignées composées de plantes dont le phénotype est bien défini et souvent éloigné des formes initiales.

Certaines espèces cultivées ont échappé à cette évolution dirigée et, parmi elles, l'Asperge est sans doute celle qui a conservé le plus fidèlement son aspect primitif. Connue et cultivée depuis l'Antiquité, appréciée des Grecs et des Romains sous une forme qui paraît avoir été très voisine de celle que nous connaissons, l'Asperge est sans doute un bon exemple d'espèce cultivée peu évoluée. A ce titre, elle constitue un matériel intéressant pour les chercheurs désireux de se livrer, sur une plante supérieure, à l'étude de populations panmictiques en leur état d'équilibre naturel.

Par ailleurs, la superposition chez Asparagus officinalis L. de divers caractères biologiques et génétiques, en fait une espèce digne d'attention :

1°) C'est une espèce considérée comme dioïque ; toutefois, le polymorphisme floral, l'existence, chez les individus de chaque sexe, d'organes avortés, mais facilement discernables, du sexe opposé et le comportement bisexué de certains individus apparemment mâles, conduisent naturellement à penser que la sexualité de cette espèce n'est pas très éloignée de l'hermaphrodisme.

L'Asperge, à cet égard, paraît être un bon matériel pour l'étude de l'évolution des formes sexuelles et en particulier des mécanismes responsables du passage de l'état hermaphrodite à l'état dioïque.

2°) C'est une espèce qui présente une tendance naturelle à la polyembryonie et qui a déjà été utilisée pour une étude génotypique des diverses manifestations de ce caractère (RANDALL et RICK, 1945). L'examen de l'hérédité de la polyembryonie et des facteurs génétiques qui en sont responsables, entrepris chez quelques espèces, n'a pas été abordé chez l'Asperge où il revêt cependant un intérêt particulier en raison de la présence d'individus haploïdes⁽¹⁾ parmi les plantes jumelles issues de graines polyembryoniques.

3°) L'apparition (plus ou moins fréquente) d'individus haploïdes, qui résulte généralement de la polyembryonie, fait de cette espèce dioïque ou subdioïque un cas très particulier. Il ne semble pas, en effet, que la présence de graines polyembryoniques ni d'individus haploïdes ait jamais été signalée parmi les espèces dioïques ou subdioïques.

Les haploïdes offrent des possibilités intéressantes à divers titres

a) ils permettent évidemment d'acquérir un certain nombre d'informations concernant l'état haploïde (sur lequel nous sommes généralement mal renseignés) et sur les effets du dosage génomique sur les caractères de l'espèce ;

b) ils sont la seule source susceptible de fournir instantanément des individus homozygotes (par doublement de leur génome) ; l'état homozygote doit être atteint d'emblée lors du doublement, ce qui permet d'espérer l'identité quasi totale des deux génomes obtenus. Les mutations n'ayant pas le temps de créer une hétérozygotie appréciable au cours du processus, il est évident qu'un tel matériel peut représenter un outil de travail précieux pour des études génétiques ;

(1) Un "haploïde" est un individu sporophytique portant le nombre gamétique de chromosomes (BURNHAM, 1962).

c) chez une espèce à sexes séparés, l'observation du sexe des haploïdes obtenus respectivement à partir de plantes femelles et à partir de plantes hermaphrodites (et de leurs homologues diploïdes) devrait fournir des renseignements utiles pour l'étude des facteurs déterminant le sexe ;

d) l'héritabilité de l'aptitude à la production d'haploïdes et, s'il y a lieu, les facteurs génétiques responsables de ce caractère pourraient à cette occasion être précisés ;

e) au cas où des observations de méiose seraient possibles, elles devraient fournir, par l'étude des éventuels appariements chromosomiques, des renseignements sur l'origine diploïde ou polyploïde de l'espèce.

Chacun de ces centres d'intérêt pourrait, bien entendu, être évoqué à propos d'autres espèces mais il est très improbable que l'on puisse les trouver réunis ailleurs que chez Asparagus officinalis. C'est pourquoi il nous a paru utile d'entreprendre l'étude de cette espèce dont la manipulation est cependant délicate en raison des délais nécessaires à la réalisation de chacune des étapes de la vie des plantes.

L'Asperge est en effet une espèce pérenne dont la vie s'étale sur 12 à 15 ans. Dans les conditions naturelles, l'apparition des premières fleurs ne survient que 12 à 15 mois après le semis chez les plantes mâles, quelquefois davantage chez les femelles, ce qui, compte-tenu des délais de maturation des graines, porte à environ 2 ans la durée d'une génération. La culture en serre permet cependant de réduire ces délais. La longévité de l'espèce présente un avantage dans la mesure où elle permet de conserver des géniteurs au cours de plusieurs générations. Par contre, les dimensions importantes atteintes par les plantes âgées sont un inconvénient dans la mesure où elles entraînent la limitation du nombre des individus cultivés en serre.

En résumé, l'Asperge présente un certain nombre de caractéristiques inhabituelles qui paraissent exploitables dans divers domaines de recherches biologiques. A ce titre, elle mérite d'être étudiée fût-ce au prix d'une longue patience et de quelque obstination.

Le travail que nous exposons ici ne prétend être ni une étude exhaustive de l'un des caractères cités, ni une synthèse complète des renseignements recueillis de par le monde par tous les chercheurs qui se sont intéressés à l'espèce. Nous avons tenté de réaliser sur quelques points particuliers de la biologie de l'Asperge cultivée une mise au point de l'état actuel des connaissances, en y apportant autant que possible quelques modestes compléments.

Les études que nous avons entreprises ne sont pas terminées et nul ne peut prévoir quand elles le seront eu égard aux difficultés signalées plus haut. Il nous a paru utile de ne pas attendre la conclusion lointaine de ces recherches pour en publier les premiers résultats.

Après un bref rappel de la systématique du genre, nous exposerons successivement :

- nos recherches sur la sexualité chez Asparagus officinalis ;
 - une mise au point bibliographique sur les diverses formes de polyembryonie en général et chez l'Asperge en particulier ;
 - nos recherches sur l'haploïdie chez Asparagus officinalis ;
 - enfin l'utilisation de nos travaux pour l'amélioration de l'espèce.
-

RAPPELS SUR LA SYSTEMATIQUE DU GENRE ASPARAGUS

Asparagus officinalis est la seule espèce cultivée consommable du genre Asparagus. Ce genre appartient à la tribu des Asparageae, sous-famille des Asparagoïdées (ou Asparagaceae d'après BAKER, 1875), famille des Liliacées.

On peut résumer les caractères du genre Asparagus : monocotylédone à fleurs régulières verticillées de type 3, à ovule anatrope, à albumen non amylicé ; le périanthe est pétaloïde, l'ovaire supère, les fruits sont des baies, les feuilles persistantes sont réduites à un éperon conique, les organes d'assimilation sont des cladodes ne portant jamais de fleurs, le pédoncule floral est articulé. Le genre présente une tendance à la polygamie⁽¹⁾

Les renseignements concernant la systématique du genre sont relativement peu nombreux. L'espèce A. officinalis a été plus étudiée que les autres en raison de l'intérêt alimentaire qu'elle présente.

L'Index de KIEW mentionne plus de 200 espèces d'Asparagus et le nombre des espèces présentes dans l'ancien monde est évalué par divers auteurs à 300 ou 400.

- BAKER, en 1875, expose quelques caractères généraux du genre, et la biologie de 97 espèces réparties en 3 groupes :

I : Eusparagus polygame, à cladodes subulés ou linéaires.

Ce groupe aurait son origine en Europe méditerranéenne et centrale et dans le centre, le nord et l'est de l'Asie. Il compte 26 espèces dont A. officinalis.

(1) Chez une espèce polygame, on rencontre à la fois des fleurs hermaphrodite et des fleurs unisexuées (EMBERGER, 1960).

II : Asparagopsis à fleurs bisexuées et cladodes subulés ou linéaires (67 espèces).

III : Myrsiphyllum à fleurs bisexuées et cladodes lancéolés ou ovales (4 espèces).

Ces 2 groupes auraient leur origine dans le continent africain et les régions tropicales et méridionales de l'Asie.

Les 3 groupes sont subdivisés d'après le port.

Après BAKER (1875), divers chercheurs se sont intéressés à la systématique du genre :

- NORTON (1913), à l'occasion de son étude sur la résistance à la rouille chez A. officinalis, a recherché les liens pouvant exister entre les populations cultivées et les formes spontanées des espèces voisines d'Europe et d'Asie.

- D'après FLORY (1932), A. officinalis serait la seule espèce dioïque parmi la centaine d'espèces du genre, ce qui est en contradiction avec l'étude de BAKER.

- En 1956, THOMPSON et HEPLER, à l'occasion d'une nouvelle étude concernant la résistance à la rouille dans le genre Asparagus, classent 26 espèces en 2 groupes : dioïques (10 espèces) et bisexuées (16 espèces). Ce classement ne contredit pas celui de BAKER (1875).

- ISHII (1955 et 1957) a étudié la cytologie de quelques espèces dont il fournit les caryotypes. Il signale la parenté qui existe entre 3 espèces appartenant au groupe des dioïques.

- Enfin, dans une étude récente, BOZZINI (1959 et 1961) signale que les caractères morphologiques et biologiques adoptés comme critères de classification par les précédents auteurs n'auraient pas tous une égale valeur : certains caractères des cladodes seraient souvent des sources de confusion et

la longueur des entre-nœuds des rameaux n'aurait aucun intérêt taxonomique. Certains caractères n'auraient de valeur discriminante que chez quelques espèces (longueur, couleur et articulation des pédoncules floraux, nombre de faisceaux criblo-vasculaires, nombre d'ovules par loge). L'auteur utilise comme premiers critères de classification le type des fleurs (dioïque ou bisexué), le caractère des pousses (pérenne ou annuel), le port (érigé ou volubile), la rigidité des éperons, la teinte de l'épicarpe des fruits, la disposition et le nombre des fleurs par verticille. Pour les déterminations spécifiques, il utilise, autant que possible, la forme des cladodes, le nombre de faisceaux criblo-vasculaires, la grosseur et la forme des graines, le temps de développement des ébauches florales et, dans certains cas, la saveur des turions. L'auteur considère que l'utilisation, comme caractère de détermination, de la forme et du type de développement du rhizome, serait intéressante. Toutefois, nous avons eu souvent l'occasion d'observer chez Asparagus officinalis de grandes variations de ces caractères depuis la forme droite linéaire jusqu'à l'aspect en touffe, en passant par le type ramifié, et il paraît difficile de considérer ce caractère comme spécifique.

Dans l'ensemble, la classification du genre et la délimitation des espèces paraissent complexes en raison de la grande variabilité de certains critères de détermination. BOZZINI (1959) pense qu'une part importante de l'évolution a pu se faire par polyploïdie (le nombre de base du genre pourrait alors être inférieur à 10).

L'espèce Asparagus officinalis qui a $2n = 20$ chromosomes, se distingue des espèces voisines par les caractères suivants : cladodes en forme d'aiguilles sétacées, rassemblés en faisceaux par 3 à 9 ; pédoncules floraux jamais articulés au sommet ; anthères longues de 1,5 à 2 mm ; petites baies de 6 à 10 mm de diamètre ; turions de saveur douce ; tiges érigées de 0,4 à 2 m ; cladodes de longueur variable entre 4 et 20 mm ; pédoncules floraux

longs de 8 à 12 mm ; pollen de couleur jaune orangé ; baies à 3 à 6 graines, semi-anguleuses-convexes, de 3 à 4 mm de diamètre.

BOZZINI a réalisé une hybridation interspécifique entre A. tenuifolius Lamk. et A. officinalis. Dans ce croisement, le complexe de caractères morphologiques et physiologiques d'A. officinalis est nettement dominant sur celui d'A. tenuifolius. D'autre part, dès la F_1 , apparaît une barrière de stérilité partielle qui abaisse le taux de fertilité du pollen à moins de 70 % et le nombre de graines par fruit à 1,5 en moyenne. Ces phénomènes sont plus accentués à la F_2 . Il existe cependant entre ces 2 espèces une nette affinité génomique et les images de méiose chez l'hybride F_1 sont normales pour les métaphases et anaphases I et II. BOZZINI (1959) classe d'ailleurs ces 2 espèces dans les sections les plus voisines de sa classification. Une troisième espèce, A. scaber Brignoli, paraît aussi voisine d'A. officinalis, mais elle compte $2n = 40$ chromosomes.

En définitive, lorsqu'on examine les classifications fournies par les divers auteurs pour le genre Asparagus, on est surpris par le nombre élevé d'espèces déterminées d'après des critères souvent peu précis faisant intervenir des caractères trop fluctuants. Il en résulte une impression de confusion et l'on peut se demander s'il n'y a pas, entre des espèces classées sous des noms différents, certains degrés de parenté, en particulier lorsque les distinctions se font entre espèces "polygames" et espèces "hermaphrodites".

Chapitre I

LA SEXUALITE CHEZ ASPARAGUS OFFICINALIS

La connaissance du déterminisme du sexe, et de ses éventuelles modifications, revêt chez l'Asperge un double intérêt biologique :

- d'une part, chez cette espèce habituellement dioïque, l'existence de cas exceptionnels de monoecie permet d'envisager l'autofécondation comme une voie possible vers l'homozygotie.

- d'autre part, l'incidence de la dioecie sur le sexe des haploïdes constitue un élément important dont il est impossible de ne pas tenir compte dans un programme de travail fondé sur l'utilisation des haploïdes.

Nous exposerons tout d'abord nos observations concernant la biologie florale, les caractères sexuels et le déterminisme des formes sexuelles, puis les hypothèses que l'on peut être amené à formuler à propos de la sexualité chez Asparagus officinalis.

A. BIOLOGIE FLORALE ET SEXUALITE

L'Asperge est une espèce généralement dioïque. En 1878, BREITENBACH signale le polymorphisme des fleurs et considère, à cette époque, l'espèce comme trioïque en raison de l'existence d'individus dont les fleurs portent simultanément les organes des deux sexes complètement développés. Par la suite, l'espèce est considérée unanimement comme dioïque, ou subdioïque (CORRENS, 1928) (FLORY, 1932) car les individus bisexués ne se rencontrent qu'exceptionnellement. La description des fleurs mâles et des fleurs femelles ne fait, en principe, l'objet d'aucune controverse : les fleurs mâles ont 6 étamines bien développées.

et un pistil dont toutes les pièces sont réduites, les fleurs femelles ont un pistil bien développé, de type 3, et 6 étamines rudimentaires blanchâtres. Mais l'existence de fleurs morphologiquement intermédiaires rend délicate la discrimination du sexe des plantes et a donné lieu à des interprétations diverses. NORTON (1913) observe une plante dont les fleurs pourvues d'étamines et dépourvues de stigmate ont produit de petites baies contenant chacune une seule graine à tégument incomplet. LEWITSKY (1924), étudiant l'évolution des organes des 2 sexes au cours du développement des fleurs, conclut que toutes sont potentiellement hermaphrodites et que les organes de l'un des deux sexes avortent sous l'effet de conditions internes et externes conjuguées. ROBBINS et JONES (1925) décrivent 5 types de fleurs : à pistil développé fortement (type 1), à pistil développé faiblement (type 2), hermaphrodites (type 3), à étamines développées faiblement (type 4), à étamines développées fortement (type 5) et signalent qu'une même plante peut porter à la fois les types 1 et 2 ou bien les types 4 et 5. SHOJI et NAKAMURA (1928) considèrent que seules les plantes porteuses d'étamines présentent un développement variable des pièces de l'autre sexe. FLORY (1932) rejoint ces conclusions : des mensurations effectuées sur les pièces florales confirment l'existence de 3 types de fleurs à étamines dans lesquels le développement du pistil serait inverse de celui des étamines. Par la suite, SNEEP (1953), HUYSKES et SNEEP (1962), VAZART (1959) tentent d'apporter quelques précisions sur la morphologie florale de l'Asperge et ses rapports avec la sexualité. Nos observations personnelles, portant sur des populations de type Argenteuil, nous permettent de distinguer (photo n° 1) :

1. Les fleurs femelles portant un pistil bien constitué, à stigmate trilobé et 6 étamines rudimentaires blanches.

2. Les fleurs de type hermaphrodite portant un pistil de taille comparable à celui des fleurs femelles (et morphologiquement bien constitué) et 6 étamines



Photo n° 1 Divers types de fleurs (x 6)
De gauche à droite :
une fleur de type 1 : femelle
une fleur de type 2 : hermaphrodite
trois fleurs de type 3 : andromonoïques ou mâles



Photo n° 2 Fleur et baie de type 2 (x 5,5)
Gynécée complet - Etamines visibles
à la base de la baie



Photo n° 3 Fleur et baie de type 1 (x 5,5)
Pas d'étamines

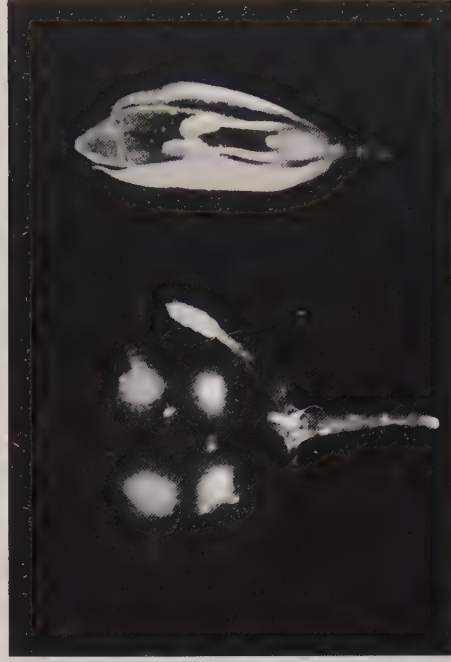


Photo n° 4 Fleur et baie de type 3 (x 5,5)
Gynécée incomplet - Etamine visible
à la base de la baie

jaunes (contenant du pollen), en tous points comparables à celles des fleurs mâles.

3. Les fleurs de type mâle ou intermédiaire portent un pistil plus ou moins réduit (ovaire de petite taille, style raccourci ou nul, stigmate uni-ou bilobé réduit à quelques papilles, ou nul), et 6 étamines jaunes contenant du pollen.

Les plantes qui portent des fleurs femelles n'en portent pas d'autres encore qu'il soit difficile d'être tout à fait affirmatif en raison du nombre élevé de fleurs apparues sur chaque individu.

La même constatation est valable pour les plantes porteuses de fleurs hermaphrodites.

Par contre, sur certaines plantes portant des fleurs du type 3, le développement du pistil est variable d'une fleur à l'autre. Il varie aussi d'une période à l'autre de la floraison et peut même, dans les cas extrêmes, aboutir à la présence de quelques fleurs du type 2.

La production de baies et de graines ne paraît pas liée de façon absolue à la morphologie des fleurs sauf dans le cas des plantes portant les fleurs de type 1. Ces plantes femelles produisent des baies contenant de 3 à 6 graines chacune. Dans certains cas exceptionnels, nous avons observé jusqu'à 11 graines et assez souvent 7 à 8 dans une baie. Pour les plantes adultes de bonne fécondité la production moyenne de graines dans nos champs est de l'ordre de 10.000 graines par pied mais nous avons dénombré jusqu'à environ 30.000 graines sur une plante.

Les plantes dont les fleurs sont du type 2 portent souvent de petites baies contenant en général une seule graine. Quelquefois, ces graines ont un tégument incomplet, ce qui leur confère un aspect panaché noir et blanc caractéristique. Le nombre de graines formées est très variable selon les individus.

Il peut varier de 0 ou 1 à plusieurs milliers. Nous en avons observé jusqu'à 5.570 sur une plante particulièrement féconde, mais ce type de plante est exceptionnel et il semble qu'en moyenne la production des individus du type 2 n'excede pas quelques centaines de graines par pied. La présence d'étamines bien développées à la base des baies (photo n°2) montre toutefois que ces fruits ne proviennent pas de fleurs femelles (photo n°3) apparues parmi les fleurs du type 1. Les plantes porteuses de telles baies peuvent être qualifiées d'hermaphrodites. Chez d'autres individus porteurs de fleurs du type 2, la nouaison ne se produit pour aucune fleur. Nos essais pour tester la fertilité des organes mâles et femelles de ces fleurs ont permis de constater que le pollen féconde des fleurs femelles normales alors que la fécondation de l'ovaire n'est pas possible même par un pollen étranger. Il semble donc que chez ces plantes, la stérilité soit d'origine femelle, ce qui est également l'opinion de VAZART (1959). Les plantes à fleurs hermaphrodites non productrices de baies se comportent finalement comme de simples individus mâles.

Les plantes porteuses de fleurs du type 3 peuvent être classées en 2 catégories selon qu'elles produisent ou non des fruits. En effet, malgré la conformation anormale du stigmate rudimentaire, observée dans la plupart des cas, la fécondation se produit probablement sur quelques fleurs, chez certains individus qui donnent des baies. Le nombre de graines obtenues varie en général de quelques unités à quelques centaines. Nous en avons observé jusqu'à 440 sur une même plante, mais la moyenne de production paraît se situer autour de quelques dizaines. Les baies sont petites et contiennent, le plus souvent, une seule graine panachée ou non (c'est sans doute ce type de fleurs qu'a observé NORTON). Il paraît certain que ces baies proviennent bien de fleurs du type 3 et non de fleurs femelles ou hermaphrodites apparues en mélange sur les rameaux d'une part en raison de la présence d'étamines à la base des fruits, d'autre part parce que les baies issues de fleurs hermaphrodites portent les reliquats

du pistil et du stigmate, très visibles pendant longtemps (photo n° 2) alors que les baies formées à partir de fleurs du type 3 ne portent que des reliquats très réduits, à l'image du style et du stigmate originels (photo n° 4). On est donc en présence d'une forme de plante monoïque dont les fleurs se rapprocheraient du type mâle. Il paraît logique d'appeler ces plantes "andromonoïques" pour les distinguer des plantes hermaphrodites dont les fleurs contiennent sous leur forme parfaite les organes des deux sexes. Dans la plupart des cas cependant, les plantes porteuses de fleurs du type 3 ne produisent pas de fruits. Ce sont les plantes mâles. Il est impossible de les déterminer par le seul examen morphologique des fleurs : seule l'apparition ou la non-apparition de baies sur une plante portant des fleurs du type 3 permet de classer cette plante comme andromonoïque ou comme mâle. Il faut signaler que la production de baies par les fleurs du type 3 n'est pas constante d'une année à l'autre et ne se produit pas forcément dès la première floraison. Il est donc possible qu'une plante considérée comme mâle devienne tout à coup andromonoïque et qu'une plante andromonoïque se comporte, certaines années, comme une plante mâle banale.

Dans leur ensemble, ces observations s'accordent avec celles de SNEEP (1953) et de VAZART (1959). Toutefois, la production de baies à partir de fleurs du type 3 n'a pas retenu l'attention de ces auteurs. SNEEP (1953) désigne sous le terme "andromonoïques" les individus porteurs de fleurs hermaphrodites et ne mentionne pas la possibilité d'apparition de baies à partir de fleurs du type 3. D'autre part l'existence, signalée par VAZART (1959), de plantes comportant à la fois des rameaux munis de fleurs femelles et des rameaux munis de fleurs bisexuées paraît contestable : nous avons eu, à diverses reprises, au cours de nos observations, l'occasion de rencontrer

des plantes qui paraissaient porter des rameaux de sexes différents. Chaque fois, nous avons vérifié, après avoir déraciné la plante, qu'il s'agissait de 2 individus imbriqués, mais distincts, issus peut-être d'embryons jumeaux ou simplement accolés par erreur lors de la plantation. Cette constatation rejoint d'ailleurs les conclusions de SNEEP (1953).

En dehors des différences morphologiques et physiologiques relevées entre les fleurs des individus mâles et femelles, on ne trouve pas, chez l'Asperge, de caractères qualitatifs nets permettant de distinguer les sexes des plantes d'après leur appareil végétatif.

De nombreux auteurs ont signalé que certains caractères quantitatifs se situent à des niveaux différents dans les deux sexes (en particulier, le rendement et la précocité sont plus élevés chez les mâles), mais aucun de ces caractères n'est exploitable pour permettre la détermination précoce du sexe longtemps avant sa floraison. Par contre, les renseignements concernant les différences de rendement et de précocité sont importants dans le domaine pratique. La supériorité de rendement des mâles soulignée, après TIEDJENS (1925), par la plupart des auteurs est évaluée, selon les cas, entre 20 et 50 % et fait ressortir l'intérêt que pourraient présenter des plantations entièrement composées d'individus mâles. Mais la détermination du sexe des griffes avant le stade de la floraison (pour ne choisir que des mâles) présente des difficultés malgré les travaux de HAYASE et KOMACHI (1954) qui préconisent l'utilisation du chlorate de potasse, toxique pour les femelles et non pour les mâles. RICK et HANNA, exposant en 1943 leur théorie du déterminisme du sexe et ses conséquences, ont apporté une contribution importante à l'établissement par SNEEP (1953) d'un programme de création de populations entièrement mâles.

B. DETERMINISME DES FORMES SEXUELLES

1°) Observations

Selon la plupart des auteurs les formes sexuelles apparaissent, dans les populations commerciales, avec une fréquence sensiblement égale pour les mâles et les femelles. Seul MALHOTRA signale en 1930 un taux de 1 mâle pour 2 femelles.

Les formes bisexuées apparaissent d'après SNEEP (1953), avec une fréquence de l'ordre de 0 à 2 pour 100 mâles soit environ 0 à 1 % de l'ensemble des plantes. Mais SNEEP signale que cette proportion est très variable selon les lots considérés.

L'observation de plantes appartenant à 13 populations commerciales d'origines diverses nous permet d'établir le tableau 1.

Les chiffres exposés dans ce tableau permettent de conclure que la répartition des plantes entre sexe mâle et sexe femelle peut correspondre à la distribution 1-1 et que l'ensemble des populations observées est homogène pour cette répartition.

D'autre part, le nombre de plantes bisexuées rencontrées est très bas : la proportion de ces plantes se situe au voisinage de 1 %. L'observation des descendance de ces plantes exceptionnelles mérite quelques commentaires. RICK et HANNA (1943), considérant seulement les proportions de "mâles" et de "femelles" dans les descendance de plantes bisexuées autofécondées, trouvent 3 mâles pour 1 femelle et donnent de ces chiffres l'interprétation suivante : "La base génétique du sexe peut être symbolisée par Mm pour une plante mâle et mm pour une femelle. Un croisement mm x Mm produit donc le même nombre de mâles Mm et de femelles mm...". Pour les fleurs bisexuées (de type

Tableau 1

Répartition des formes sexuelles chez 13 populations
commerciales d'origines diverses

n° des populations	Effectif observé	Répartition des effectifs			χ^2 (1 = 1)	P
		Mâles	Bisexués	Femelles		
1	333	178		155	1,588	>0,20
2	319	163	2	154	0,255	>0,50
3	343	162		181	1,052	>0,30
4	281	150		131	1,284	>0,20
5	290	144	2	144	0	=1
6	335	163		172	0,241	>0,50
7	325	166		159	0,150	>0,90
8	343	176		167	0,236	>0,50
9	333	165		168	0,027	>0,80
10	329	176		153	1,607	>0,20
11	304	174		130	6,368	<0,01
12	352	173		179	0,102	>0,70
20	142	79		63	1,802	>0,10
Total	4029	2069	4	1956	14,712	

Ces χ^2 sont établis pour l'hypothèse de répartition "mâles-femelles" 1-1.

Test d'homogénéité : $\chi^2 = 13,238 \rightarrow P > 0,30$

Mm), "la descendance est composée de 1 MM, 2 Mm, 1 mm. Puisque les plantes MM et Mm sont mâles, les 3/4 de la descendance seront mâles et 1/4 seulement est femelle".

A partir de cette idée, SNEEP (1953) écrit : "Les plantes MM sont très importantes. Croisées avec une femelle normale (mm x MM $\rightarrow$ Mm), elles produisent une F₁ entièrement constituée de plantes Mm, c'est-à-dire de plantes mâles".

Expérimentalement, SNEEP (1953) a vérifié l'existence de plantes MM donnant des descendance entièrement mâles. Ces plantes ne présentent phénotypiquement aucune différence avec les Mm et ne peuvent être repérées que par la composition de leur descendance en croisement avec une plante femelle.

Au cours de nos observations, nous avons tenté d'étudier les descendance de diverses plantes bisexuées de types hermaphrodite et andromonoïque. Les observations portent non seulement sur le nombre des individus mâles et femelles mais aussi sur celui des bisexués présents dans chaque descendance. (Tableau 2).

La première partie du tableau 2 présente, pour 3 plantes, les chiffres observés en fécondation libre et en autofécondation. Cette étude a pour but de comparer les descendance obtenues avec l'un ou l'autre des modes de pollinisation pour les nombres respectifs de plantes mâles et de plantes bisexuées (au cas où des différences apparaîtraient parmi les plantes "staminées"⁽¹⁾) dans les proportions de mâles et de bisexués, on pourrait conclure que les plantes non isolées ne s'autofécondent pas forcément). En réalité, les différences ne sont pas significatives pour l'ensemble des 3 plantes.

(1) plantes "staminées" : plantes porteuses d'étamines fonctionnelles par opposition aux plantes femelles dont les étamines sont avortées.

Tableau 2

Répartition des formes sexuelles chez les plantes
descendant d'individus bisexués

	Type	Effectifs observés	Répartition des effectifs			% de "staminés"	χ^2 3-1	P
			staminés		Femelles			
			Mâles	Bisexués				
<u>Fécondation libre</u>								
PP 1	3	207	129	44	34	83,5	8,117	$< 0,05$
PP 2	3	133	46	55	32	75,7	0,485	$> 0,30$
PP 3	2	149	72	46	31	79,0	1,397	$> 0,20$
<u>Autofécondation contrôlée</u>								
PP 1	3	121	78	10	33	72,5	0,333	$> 0,50$
PP 2	3	281	88	114	79	71,8	1,452	$> 0,20$
PP 3	2	46	26	9	11	76,0	0,028	$> 0,80$
β 19-2	2	236	116	63	57	75,8	0,089	$> 0,70$
1-2a 15	2	54	27	9	18	66,2	2,000	$> 0,10$
6-2a 8	2	50	22	17	11	78,0	0,240	$> 0,50$
α 16-24	2	38	21	7	10	73,6	0,034	$> 0,80$
6-5c 17	2	21	3	14	4	80,9	0,396	$> 0,50$
Totaux pour 1'autofécondation contrôlée		847	381	243	223		4,572	

Ces χ^2 sont établis pour l'hypothèse de répartition "staminés-femelles" 3-1

Test d'homogénéité pour
1' autofécondation contrôlée : $\chi^2 = 3,776 \rightarrow P > 0,70$

D'autre part, la plante PP 3 porte un facteur récessif de déficience chlorophyllienne (peu fréquent dans les populations) qui a entraîné l'apparition de 36 plantes sans chlorophylle sur 176 descendants en fécondation libre (soit environ 20 %) et de 26 plantes sans chlorophylle sur 146 descendants en autofécondation (soit environ 18 %). Ces pourcentages ne diffèrent pas significativement, ce qui confirme l'autogamie naturelle des plantes bisexuées.

La deuxième partie du tableau 2 ("Autofécondation contrôlée") appelle 2 remarques :

1. La disjonction entre plantes femelles et plantes staminées se fait bien selon des proportions qui peuvent correspondre aux valeurs 1-3 dans toutes les descendance. L'ensemble des populations observées est homogène pour cette répartition.

2. La répartition des formes mâles et bisexuées parmi les plantes staminées présente d'importantes différences d'une descendance à l'autre et ne paraît pas directement liée au type de la plante mère.

Comment peut-on interpréter ces remarques ?

Si l'on tient compte seulement de la répartition des descendants entre femelles et staminés on peut admettre sans réserve la théorie du sexe (1943) hétérogamétique émise par RICK et HANNA, et considérer que la présence ou l'absence de l'élément M détermine le sexe à étamines ou le sexe femelle. Cette théorie pourrait être confirmée par des observations cytologiques : au cours d'études cytogénétiques dont les premières semblent remonter à 1923, 10 paires de chromosomes ont pu être dénombrées et décrites ; les méioses ont été observées sur étamines normales de fleurs mâles et sur étamines avortées de fleurs femelles. Dans les étamines normales, KAMO, dès 1929, avait entrevu l'existence d'une paire de chromosomes dont les deux éléments n'étaient pas identiques et

qui pouvaient être des chromosomes sexuels. En 1960, REIMANN PHILIPP et al. confirment l'existence chez les mâles d'un bivalent hétéromorphe. Ils observent de plus, en méiose chez certains descendants mâles de plantes bisexuées auto-fécondées, une paire de chromosomes identiques mal soudés qui représenterait le couple MM signalé par RICK et HANNA (1943). Toutefois, aucune vérification sur mitose n'a permis d'établir clairement l'existence d'un hétérochromosome (WESTERGAARD, 1958). Quoiqu'il en soit, il semble que l'on puisse admettre la liaison étroite qui paraît exister entre l'élément M et la présence d'étamines fonctionnelles chez une plante.

Sur les étamines rudimentaires des fleurs femelles, les observations successives de SHOJI et NAKAMURA (1928), KAMO (1929), FLORY (1932), HUNTER (1953), YARNELL (1954), ISHII (1957), VAZART (1959), FURUSATO et SHIMOTSUMA (1960), s'accordent pour signaler que les divisions méiotiques se produisent jusqu'à un stade plus ou moins avancé allant de la métaphase hétérotypique aux tétrades, selon les auteurs. Nos observations confirment la présence de tétrades dans les anthères chez les fleurs femelles.

Peu d'études ont été faites sur l'évolution de l'ovaire des fleurs staminées. D'après SHOJI et NAKAMURA (1928), l'ovule commencerait à dégénérer lors de la division homéotypique. Aucun renseignement ne permet actuellement de savoir quels sont les facteurs responsables de cette dégénérescence qui, lorsqu'elle ne se produit pas, permet aux plantes staminées de se comporter en bisexuées. On constate seulement que la fertilité des organes femelles n'est pas liée à l'absence de l'élément M, puisqu'on la rencontre chez des plantes possédant ou non cet élément, et le possédant même à l'état homozygote (SNEEP, 1953).

L'état bisexué d'une plante staminée résulte semble-t-il de facteurs complexes : le milieu joue sans doute un rôle important. On a vu comment des plantes, considérées comme mâles pendant une ou plusieurs années, commencent à produire des graines tandis que des plantes bisexuées cessent parfois d'en produire. Mais les facteurs essentiels responsables de la bisexualité parmi les plantes M sont probablement des facteurs internes : nous avons pu constater qu'en autofécondant une plante bisexuée donnée, on obtient des proportions de mâles et de bisexués à peu près constantes, quelles que soient les conditions de l'autofécondation d'une part, et de la culture de la descendance d'autre part. Il semble que le milieu n'intervienne qu'en affectant les délais d'apparition des fruits et la quantité de graines formées. Il y a donc dans chaque plante bisexuée une aptitude déterminée à produire des bisexuées par autofécondation. Cette aptitude est sans doute de nature génétique car elle paraît se transmettre à une fraction des descendants : par exemple, la plante 6-5c 17 autofécondée, produit régulièrement parmi ses descendants, plus de bisexués qu de mâles ; la plante 6-5c 17-6, qui est un des descendants bisexués, a produit, par autofécondation, 51 bisexués pour 10 mâles. On peut considérer que le caractère bisexué est complexe et héréditaire et que les conditions de milieu peuvent intervenir ensuite sur ses manifestations extérieures.

Des études sont en cours pour examiner les proportions de mâles et de bisexués, d'une part sur des descendances en 3ème et 4ème générations autofécondées, d'autre part sur des croisements entre bisexués et plantes normales. On tentera, de plus, de connaître les conditions de milieu les plus favorables à la manifestation du caractère bisexué, caractère dont l'importance peut nous échapper.

2°) Hypothèses sur l'origine possible de la séparation des sexes

Asparagus officinalis est une espèce dioïque d'un genre dont beaucoup d'autres espèces sont à fleurs bisexuées. Les organes d'un sexe existent toujours, à l'état plus ou moins rudimentaire sur les plantes de sexe fonctionnellement opposé. Ces deux circonstances permettent de penser qu'il s'agit d'un phylum dérivé d'un ancêtre bisexué, qui a subi une "spécialisation sexuelle" d'un type assez fréquent, en définitive, chez les végétaux.

a) Selon VALDEYRON (1967), on peut penser qu'une telle évolution s'amorce par une mutation récessive, transformant un certain gène M en son allèle m , tel que l'homozygote mm est mâle-stérile.

nombre moyen de gamètes femelles transmis à la génération
suivante par un individu m

$$\omega = \frac{\text{nombre moyen de gamètes femelles transmis à la génération suivante par un individu } m}{\text{nombre moyen de gamètes femelles transmis à la génération suivante par un individu } M}$$

Soient

nombre moyen de gamètes femelles transmis à la génération
suivante par un individu M

$2f$ = nombre total de gamètes transmis en moyenne par un individu M
aux individus de la génération suivante

Pour que la fréquence des gènes M et m reste constante d'une génération à l'autre, il faut et il suffit que le nombre total de gamètes (donc de gamètes femelles) transmis en moyenne par un individu m soit aussi $2f$.

Or, le nombre moyen de gamètes femelles transmis par un individu de la population est forcément égal au nombre moyen de gamètes mâles, et vaut donc f . Mais si f doit être la moyenne entre $2f$ et le nombre de gamètes femelles transmis en moyenne par individu M , c'est que ce dernier nombre doit être inférieur à f . Il s'ensuit que ω doit être égal au rapport de $2f$ à un nombre inférieur à f , ce qui entraîne que ω doit être supérieur à 2 : pour qu'un gène

de stérilité mâle s'implante dans une population, il faut qu'il confère aux individus mâle-stériles une fertilité femelle plus de deux fois supérieure à celle des individus mâle-fertiles.

Cette condition peut-elle être remplie ? Il ne paraît pas invraisemblable qu'elle le soit. La quantité énorme et manifestement exagérée de pollen produit par beaucoup de plantes à fleurs est un exemple classique des effets de la sélection sexuelle (HUXLEY, 1942).

L'arrêt de la dépense consentie en vue de ce gaspillage peut parfaitement se traduire par une amélioration de la production des organes femelles, même si cet arrêt est relativement tardif, comme dans le cas de l'Asperge pour laquelle les étamines parviennent jusqu'au stade de la méiose. En tout état de cause, il importe peu qu'une telle dérivation des possibilités mâles vers la production de gamètes femelles se produise souvent ou non : il suffit qu'elle se produise une fois. Nous avons dit plus haut que, lorsque la production moyenne de graines est, chez les plantes femelles de fertilité normale, de l'ordre de 10.000; elle est de l'ordre de quelques dizaines chez les andromonoïques et de quelques centaines chez les hermaphrodites ; la production de gamètes femelles des plantes femelles est donc plus de 10 fois supérieure à celle des bisexués. Qu'une partie au moins de cette supériorité soit à l'origine de la dioécie n'aurait rien d'extraordinaire.

Il est en effet évident que l'implantation d'un gène tel que m , qui apporte un supplément de fertilité femelle nettement supérieur à deux, ne peut qu'entraîner la dioecie : une population se reproduit d'autant plus que l'équilibre entre les fréquences des gènes M et m s'établit à un niveau favorisant la fréquence des individus m (c'est-à-dire que ω est grand). Or, les individus m ne peuvent provenir que des fécondations qui ne font pas intervenir le génotype MM . La sélection naturelle tendra donc à réduire le nombre

d'homozygotes MM, ce qui ne peut être réalisé (s'il y a bien dominance de M sur m) qu'en diminuant le nombre de gamètes femelles susceptibles de porter M, donc par une évolution des formes M vers la stérilité femelle.

A la limite, la population se composera de $\frac{1}{2}$ Mm (mâles) + $\frac{1}{2}$ mm (femelles).

Une telle évolution peut être réalisée de deux façons au moins :

1. S'il existe, sur le chromosome qui porte le locus occupé par M ou m, un gène, su, dont un allèle dominant, Su, entraîne la suppression de l'activité femelle, les gènes M et Su peuvent constituer une amorce d'hétérochromosome Y, leurs allèles m et su formant la partie correspondante de l'hétérochromosome X. Les deux loci doivent être situés suffisamment près l'un de l'autre pour que les crossing-over soient très rares, à moins que le chromosome ne porte, dans cette région, un suppresseur de crossing-over, une inversion, par exemple. Cette dernière situation pourrait être celle mise en évidence par WESTERGAARD (1958) chez Melandrium.

Chez l'Asperge, les crossing-over pourraient expliquer l'apparition d'hermaphrodites, correspondant aux gamètes M su. On devrait alors trouver, en fréquence égale, des individus de génotype mm Su su dont on ne voit pas, a priori, quel pourrait être le phénotype. Il pourrait y avoir épistasie de Su sur m et on aurait alors des mâles. On s'attendrait plutôt à des individus porteurs de fleurs stériles, exclusivement. Nous n'en avons jamais rencontré. Par contre, l'absence totale de fleurs survient assez fréquemment chez certains individus de nos populations. Il est possible que ce caractère soit une manifestation de la stérilité de certains génotypes. Leur fréquence ne pourrait être appréciée qu'après plusieurs années d'observations ; la mise à fleurs de certains individus femelles est très lente, et il est impossible de savoir si une plante de quatre ou cinq ans qui n'a jamais fleuri est stérile ou seulement tardive.

L'existence d'un supprimeur femelle dominant peut paraître surprenante, au premier abord. Il n'est pas impossible qu'il s'agisse d'un régulateur super-réprimé du type mis en évidence par JACOB et MONOD (1961) chez les micro-organismes.

2. Ce que l'on sait des gènes de régulation tend à nous faire penser que de tels supprimeurs sont rares et il doit y avoir de nombreux gènes généralement récessifs $r_1, r_2, r_3...$ qui entraînent la stérilité femelle, comme d'autres le font pour la stérilité mâle. Certains de ces gènes peuvent être hypostatiques par rapport au gène de stérilité mâle m ; ils remplissent alors toutes les conditions voulues pour être favorisés par la sélection lors de l'évolution vers la dioécie et pour s'implanter dans les populations avec une fréquence appréciable. En l'absence d'un couple du type Su, su , dont le locus ne peut qu'être lié de façon constante à celui de M, m , de tels couples R, r , pourraient expliquer des situations telles que celle décrite chez Mercurialis annua L. par DURAND (1963) : la fréquence des individus bisexués chez cette espèce paraît varier avec les populations ; ces variations pourraient être en rapport avec des différences de fréquences géniques pour les couples R, r , suivant les couples d'une part, suivant les milieux pour un même couple, d'autre part.

L'Asperge semble posséder les deux systèmes. Les résultats des autofécondations donnés au tableau 2 montrent que la stérilité femelle n'est pas dominante chez les descendants de bisexués ; ces résultats sont tout à fait hétérogènes, ce qui marque bien que plusieurs couples de gènes sont en disjonction. PEIRCE et CURRENCE (1962), sélectionnant pour la bisexualité dans la descendance d'individus bisexués autofécondés, obtiennent une proportion croissante de bisexués dans les générations successives, ce qui suppose également plusieurs couples de gènes en disjonction, avec récessivité des allèles de

stérilité femelle. Toutefois, les mêmes auteurs, lorsqu'ils croisent les bisexués résultant de la sélection précédente (donc débarrassés des récessifs de stérilité femelle) avec des mâles et des femelles pris dans une population ordinaire, obtiennent des ségrégations qui ne sont pas interprétables si l'on n'admet pas l'existence, chez les géniteurs mâles, d'un supprimeur femelle dominant lié à l'hétérochromosome. Cette interprétation n'est cependant pas celle des auteurs, qui doivent faire intervenir des hypothèses complémentaires pour expliquer leurs résultats. Tout se passe en somme comme si de rares crossing-over se produisaient entre les loci des gènes M et Su, maintenant dans la population une certaine proportion de plantes M su ; contre le danger de perte de fertilité que représentent ces plantes, la sélection naturelle maintiendrait une série de récessifs de stérilité femelle, dont quelques uns existeraient normalement à l'état hétérozygote, chez toute plante bisexuée non sélectionnée pour la bisexualité.

b) BERNINGER (1967) envisage d'une autre manière la transformation d'une population bisexuée en population dioïque : soit une population mm initialement bisexuée à reproduction allogame prépondérante, dans laquelle apparaît un allèle mutant m' tel que les individus [m'] présentent une forte réduction de leur potentialité femelle (pouvant aller jusqu'à la disparition totale de ces potentialités). L'économie métabolique réalisée de ce fait permettrait une augmentation importante des potentialités mâles se traduisant par une production de pollen très supérieure à celle des bisexués. Si les plantes [m'] produisent au moins 2 fois plus de pollen que les [m], l'allèle m' peut s'installer dans la population.

Simultanément ou après, une modification cytoplasmique surviendrait (apparition d'un cytoplasme [S]) tel que [N][m] bisexué, transformé en [S][m], soit mâle-stérile (donc femelle) et que [S][m] fait une production de graines

légèrement supérieure à celle des bisexués (ce phénomène est observable chez l'Oignon et chez diverses populations gynodioïques). Le cytoplasme $[S]$ envahit dès lors la population et supprime $[N]$. S'il entraîne la stérilité mâle dans tous les cas, les individus $[S][m']$ sont complètement stériles ou très légèrement femelle-fertiles et le gène m' se perd ; mais si m' est un mainteneur de fertilité mâle sur $[S]$ (avec pleiotropie) on arrive à une population composée de $[S][m]$ (femelles) et de $[S][m']$ (mâles ou légèrement bisexués) dans les proportions d'équilibre 1-1.

Dans le cas de l'Asperge m' serait un allèle dominant.

L'existence d'individus bisexués dans les populations pourrait s'expliquer par la survivance d'individus du type initial qui, dans le cas où ils se seraient autofécondés, se seraient maintenus sur cytoplasme $[N]$ et ne donneraient, par autofécondation, que des bisexués, à moins qu'ils ne portent la mutation m' auquel cas ils donneraient des mâles et des bisexués.

Nous n'avons pas, parmi les bisexués répartis dans les populations, observé d'individus dont la descendance en première autofécondation ne contient aucune femelle.

La présence de bisexués pourrait aussi s'expliquer par une atténuation de l'effet du cytoplasme $[S]$ dans des génotypes $[S]mm$.

c) Quels que soient les processus mis en cause, l'origine bisexuée de l'espèce Asparagus officinalis paraît très probable. La viabilité des individus homozygotes pour le facteur M peut être un argument pour considérer avec WESTERGAARD (1958) que l'Asperge est une espèce d'évolution récente chez laquelle l'hétérochromosome, s'il existe, serait peu différencié et ne porterait guère que des facteurs sexuels.

Chapitre II

L'ASPERGE ET LES DIVERSES FORMES DE POLYEMBRYONIE

(Mise au point bibliographique)

Outre les données concernant la sexualité chez l'Asperge, il faut aussi mentionner un caractère remarquable de cette espèce : sa tendance à la polyembryonie, signalée dès le milieu du 19^{ème} siècle. En 1939-1940, RANDALL et RICK trouvèrent de nombreuses plantules jumelles chez l'Asperge et virent dans cette espèce un matériel convenable pour l'étude de la nature et de l'origine de la polyembryonie. Leurs résultats, publiés en 1945, et qui mentionnent en particulier l'existence, parmi les plantes jumelles, d'individus haploïdes sont à l'origine de nos travaux ; c'est pourquoi il nous paraît utile de les résumer ici et de situer Asparagus officinalis parmi les autres cas de polyembryonie végétale.

On ne peut aborder la question de la polyembryonie végétale sans se référer à la remarquable mise au point qu'en a fait WEBBER (1940). Nous avons emprunté à cet auteur de nombreux exemples qui, dans le texte, seront marqués d'un (W) ou signalés explicitement.

Une revue rapide de l'ensemble des connaissances concernant la polyembryonie permet de constater que les manifestations et les origines de ce phénomène peuvent être très diverses.

A. FREQUENCES

Lorsque l'appréciation de la fréquence de polyembryonie se fait à partir de graines germées, elle ne tient compte que des manifestations extérieures du caractère et ne fait pas entrer en ligne de compte les graines constitutivement polyembryonnées et dont, pour une raison quelconque, un embryon seulement ne serait développé. La fréquence "observée" varie entre espèces, variétés ou même lignées. Selon WEBBER (1940) chez Gossypium barbadense L., on trouve dans une lignée de Sea Island une graine gémellaire sur 300, chez une autre une pour 500 ; chez les autres espèces de Gossypium à 26 chromosomes, la polyembryonie est plus rare. Chez celles à 13 chromosomes, on en trouve environ un cas sur 40.000.

Parmi les autres genres, d'après WEBBER (1940), la fréquence varie de 0,01 % chez Oryza jusqu'à 42 % chez Poa. Dans la plupart des cas, elle est inférieure à 0,25 %.

On constate (W) qu'en moyenne 5 % environ des plantes jumelles ont des nombres chromosomiques différents du nombre diploïde normal, $2n$, sauf chez Poa, Triticum et Gossypium où leur fréquence est plus élevée (W).

Les observations de RANDALL et RICK (1945) sur plantules d'asperge portent sur 36 lots de graines d'origines diverses comportant chacun au minimum 500 graines, germant à environ 80 % ; 405 embryons multiples sont ainsi décelés, soit une fréquence moyenne "observée" de 0,95 pour 100 graines germées, variable selon les lots considérés : un croisement contrôlé n'a produit que 0,13 % de graines polyembryoniques tandis qu'une population commerciale de type Argenteuil en a fourni 3,54 %. Parmi les 405 graines polyembryoniques trouvées 393 contiennent 2 plantes, 11 contiennent 3 plantes et une en contient 4.

En 1953, HUNTER, après une étude analogue sur Asperge, publie les chiffres suivants : sur 2 lots contenant l'un 1922, l'autre 2448 graines, les nombres d'embryons multiples trouvés sont respectivement 5 et 24. Ces proportions se rapprochent de celles de RANDALL et RICK (1945).

B. MANIFESTATIONS ET ORIGINES

WEBBER (1940) distingue 4 formes possibles de polyembryonie. Nous adopterons cette classification et exposerons, pour chaque catégorie, les observations publiées par d'autres auteurs.

1°) La polyembryonie sporophytique donne des embryons adventifs produits à partir du nucelle (cas des Citrus) (W) ou du tégument interne de l'ovule (cas de Potentilla) (W). Ces embryons se développent (après avoir pénétré dans le sac embryonnaire) en compétition avec l'embryon gamétique, ou bien ils le remplacent. On ignore à partir de quel stade la pollinisation ou la fécondation interviennent dans le développement de l'embryon nucellaire ; GUSTAFSSON (1939) pense que ce développement est stimulé par des substances de croissance émises par le tube pollinique. D'après VAN OVERBEEK et al. (1941), ce tube contiendrait non seulement un peu d'auxine active mais aussi un groupement prosthétique qui complèterait un enzyme contenu dans l'ovaire pour activer un précurseur d'auxine. L'embryon nucellaire se développerait donc dès l'arrivée du tube pollinique dans l'ovaire. L'origine purement maternelle de ces embryons diploïdes les rend identiques à la mère et forcément identiques entre eux, sauf dans le cas particulier de Citrus (W) où certains embryons deviennent tétraploïdes par doublement de leur stock chromosomique sitôt après leur formation.

2°) La polyembryonie par clivage se traduit par le partage du zygote ou du jeune embryon en deux ou plusieurs unités dont chacune donne un embryon. Cette forme de polyembryonie est courante chez les Coniferales et chez Gnetum (W) où peu après l'amphimixie se forme un pro-embryon contenant des "initiales de l'embryon" qui donnent naissance à des embryons séparés. Le terme de polyembryonie par clivage habituellement réservé aux Gymnospermes est appliqué par WEBBER (1940) au même processus lorsqu'il se produit chez les Angiospermes. Il cite entre autres les cas de Tulipa (prolifération du pro-embryon) et de Linum, Trifolium, Medicago, Oryza, Holcus, Citrus etc. (clivage proprement dit). D'après MAHESHWARI (1950) on assiste à des cas de prolifération du suspenseur chez les orchidaceae et chez Lobelia siphilitica L. Tous les individus provenant d'un clivage sont strictement identiques entre eux.

3°) La polyembryonie simple se traduit par l'apparition dans le même ovule de plusieurs embryons diploïdes issus de la fécondation de plusieurs gamètes femelles. Elle est fréquente chez les Gymnospermes où la mégaspore produit plusieurs archégones, donc plusieurs oosphères qui sont fécondées par les tubes polliniques de plusieurs microspores germées au niveau du micropyle. Elle est anormale chez les Angiospermes dont l'oosphère est unique. WEBBER (1940) signale que, dans quelques cas (Mimosa par exemple) on a observé plusieurs embryons dont la situation à l'intérieur de l'albumen correspondait à l'emplacement de l'oosphère, ce qui laisse supposer l'existence de plusieurs oosphères. Chez Boerhaavia, il signale que KAJALE (1938) observe couramment plusieurs tubes polliniques dans un même sac embryonnaire et des synergides identiques à l'oosphère. De même, d'après WEBBER (1940) divers auteurs admettent la possibilité de fécondation de cellules du sac autres que l'oosphère, par des noyaux reproducteurs supplémentaires (synergides chez Saccharum, antipodes chez Allium et Ulmus).

Chez Crepis capillaris (L.) Wallr., GERASSIMOVA (1936) signale avoir observé 2 à 5 oosphères dans le même sac embryonnaire. Ces oosphères, forcément identiques, fécondées par des tubes polliniques différents produiront des embryons différents.

4°) La polyembryonie dite "euploïde" par WEBBER (1940) donne en principe des jumeaux euploïdes⁽¹⁾. En réalité, cette catégorie englobe :

- d'une part les cas où l'un au moins des jumeaux est haploïde ou polyploïde ;

- d'autre part les cas où les deux jumeaux sont diploïdes mais résultent respectivement de processus de fécondation différents.

Le terme de polyembryonie complexe paraît plus convenable pour l'objet qu'il désigne. Selon WEBBER, ce mode de polyembryonie a été observé pour la première fois en 1933 sur Oryza par RAMIAH et al. et sur Linum par KAPPERT qui, tous deux, signalèrent un couple de plantules jumelles constitué d'un haploïde et d'un diploïde. Des phénomènes analogues ont été mentionnés depuis, chez de nombreuses espèces et sous diverses formes : haploïde-haploïde, haploïde-diploïde, haploïde-triploïde, triploïde-triploïde. Dans quelques genres, en particulier Poa (W) on a remarqué des partenaires dont les nombres chromosomiques ne sont pas des multiples ou des sous-multiples exacts du nombre de base. Ces cas restent inexpliqués pour l'instant. Gossypium (W) paraît être le genre qui fournit le plus souvent des haploïdes (du moins chez les espèces à 26 chromosomes). Chez les autres genres, la forme la plus courante est diploïde-diploïde. On rencontre aussi des triplets triploïde-triploïde-diploïde chez Triticum (W) et diploïde-diploïde-triploïde chez Poa (W)

(1) Euploïde : dont le nombre chromosomique est un multiple du nombre de base.

Le fait qu'un triploïde survienne plus souvent qu'un haploïde en conjonction avec un diploïde, fait penser que les triploïdes proviennent du développement de noyaux de l'albumen.

Dans le cas particulier où les partenaires sont l'un haploïde et l'autre diploïde, la polyembryonie euploïde peut avoir diverses origines :

a) L'origine la plus couramment admise et confirmée cytologiquement dans certains cas, est le développement apogamique d'une synergide ou d'une antipode, parallèlement à celui de l'oosphère normalement fécondée. Ce processus a été observé par KAPPERT (1933) sur Linum usitatissimum L. et par COOPER (1943) sur divers Lilium. Chez Capsicum frutescens Willdenow, d'après MORGAN et RAPPLEYE (1954), les antipodes dégénèrent avant la fécondation et le développement des synergides serait à l'origine des cas de polyembryonie. De même chez Gossypium hirsutum L. et Gossypium barbadense (KIMBER et RILEY 1963). MAHESHWARI (1945) considère ce développement apomictique d'une cellule du sac comme l'origine la plus vraisemblable et la plus fréquente de la polyembryonie euploïde.

b) Certains auteurs, sans apporter de preuves, considèrent que la situation inverse se présente dans leur matériel : l'oosphère se développerait parthénogénétiquement tandis qu'une synergide fécondée produirait l'embryon diploïde (KIHARA, 1936, sur Triticum durum Desf. et YAMAMOTO, 1936, sur Triticum vulgare Vill.). Cette hypothèse n'apporte d'ailleurs aucune modification par rapport à la précédente quant à la constitution génétique des deux partenaires.

c) Une hypothèse plus discutable est la naissance d'un embryon à partir d'une cellule de l'albumen sans qu'aucune fécondation n'ait lieu, de sorte que l'oosphère se développe parthénogénétiquement en embryon haploïde

et l'albumen en embryon diploïde aposporique. Cette interprétation donnée par JEFFREY et HAENTL (1939), à la suite de leurs observations sur Trillium, n'est pas démontrée. Bien qu'elle soit surprenante, elle n'est pas invraisemblable : FERGUSON (1927) montre en effet sur Petunia que le noyau secondaire peut entrer en division dès que le tube pollinique est présent dans le sac embryonnaire et JORGENSEN (1928) trouve, en croisant Solanum nigrum L. x Solanum luteum Mill., que les noyaux mâles dégénèrent dans le sac mais que leur présence suffit à provoquer le développement parthénogénétique de l'oosphère.

De même MAHESHWARI et al. (1950) signalent que chez l'orchidaceae Nigritella nigra (L.) Rchb. l'embryon peut commencer à se former avant que le tube pollinique n'ait libéré ses noyaux dans le sac. Chez Orchis, on a même vu l'oosphère et une synergide entrer en division avant même que le tube pollinique n'ait pénétré dans le sac. Toutefois MAHESHWARI et al. (1950) considèrent que le développement d'embryons diploïdes à partir de cellules de l'albumen est peu vraisemblable et qu'il s'agirait plutôt de deux sacs distincts (dont l'un non réduit) qui auraient fusionné au sein d'une masse commune de tissu de l'albumen. Il devrait être possible de trancher, en tenant compte de l'homozygotie éventuelle des diploïdes : cette homozygotie devrait être totale s'il s'agit de cellules d'albumen non fécondées.

d) Un processus entièrement différent des précédents est la production de deux plantes jumelles à partir d'oosphères situées dans deux sacs différents (situation que MAHESHWARI et al., 1950, considèrent comme responsable du cas de Trillium).

L'existence de sacs embryonnaires multiples est constatée assez fréquemment chez certains genres. Lorsque le sac supplémentaire est haploïde, il peut avoir pour origine un deuxième mégasporocyte formé dans le même nucelle ou bien une mégaspore soeur non dégénérée. Ces types de sacs multiples son

à l'origine de couples haploïde-diploïde observés chez Gossypium, Oryza, Phleum, Solanum (COOPER, 1943), et chez Poa, Rosa, etc. (WEBBER, 1940).

Le développement aposporique d'une cellule du nucelle peut également donner naissance à un deuxième sac, non réduit. Cette situation, étudiée par ENGELBERT, 1941, a permis d'observer cytologiquement, chez Poa arctica R. Br. la formation d'un couple haploïde-diploïde : aucune fécondation ne se produit et les oosphères des deux sacs se développent parthénogénétiquement ; le sac réduit, issu du mégasporocyte normal, produit alors un embryon haploïde, le sac non réduit d'origine aposporique donne un diploïde. Le cas de Poa arctica paraît toutefois exceptionnel et il semble que la présence d'un sac supplémentaire non réduit produise généralement un couple diploïde-diploïde dont l'un des partenaires est d'origine zygotique, l'autre d'origine aposporique (cas de Malus, Poa, etc.) (W).

Dans la plupart des cas cependant, les sacs multiples sont issus de mégasporocytes réduits ; ils sont donc haploïdes.

Le développement du sac supplémentaire peut être déclenché par les mêmes agents chimiques qui activent le sac normal. En effet, d'après CHAPMAN (1933), les deux sacs situés dans le même nucelle sont contigus ou ne sont séparés que par deux ou trois assises cellulaires. Ils sont au même stade de développement et l'influence de toute stimulation externe doit être à peu près la même sur les deux.

D'après MÜNTZING (1937) qui a observé la présence de deux sacs chez l'Orge, la plupart des embryons multiples diploïdes se formeraient, lorsque deux sacs sont présents, soit par fécondation des oosphères de plusieurs sacs réduits, soit par parthénogénèse dans des sacs non réduits. Les triploïdes seraient dérivés de mégaspoires soeurs non réduites dont les oosphères seraient fécondées, et les tétraploïdes, de doublement somatique suivant immédiatement

l'amphimixie ou situé au début d'un développement aposporique dans un sac non réduit.

Enfin, les haploïdes proviennent forcément du développement d'un matériel préalablement réduit, non fécondé, et sans doute stimulé par la fécondation de son homologue. Ce matériel pourrait être un deuxième sac réduit développé parthénogénétiquement ou un sac initial stimulé par la pénétration du tube pollinique sans fécondation.

Parmi les origines possibles de la polyembryonie qui viennent d'être mentionnées, certaines résultent essentiellement d'observations cytologiques. La constatation "de visu" de l'existence de plusieurs sacs embryonnaires ou du développement de plusieurs cellules d'un sac embryonnaire présente dans le domaine de l'évolution et de l'embryogénèse un intérêt certain. Mais ces observations constituent des cas isolés qu'il est matériellement impossible de répéter. On ne peut donc en tirer que des hypothèses discutables quant à l'origine et à la fréquence des diverses catégories de polyembryonie.

Les renseignements que pourraient fournir des études fondées sur l'utilisation de gènes marqueurs permettraient de préciser génétiquement quelle part prennent les noyaux mâles dans l'apparition d'embryons multiples dans l'ovule.

De telles études ont été réalisées dans quelques cas : KAPPERT (1933) sur Linum usitatissimum, RAMIAH et al. (1933) sur Oryza sativa L., SKOVSTED (1939) sur Luzerne, SILOW et STEPHENS (1944) sur Coton, ont ainsi étudié les caractères de jumeaux obtenus sur des plantes portant des gènes marqueurs récessifs.

Mais dans la plupart des cas, ces travaux portent sur des effectifs extrêmement réduits. Il semble que RANDALL et RICK (1945) aient, les premiers,

tenté une étude des diverses formes d'embryons multiples par des voies génétiques en travaillant sur des effectifs importants d'Asparagus officinalis.

Ces auteurs ont étudié pour chaque paire le nombre de chromosomes, le sexe des partenaires et la présence ou l'absence d'anthocyane dans les tiges (ce dernier caractère étant considéré comme récessif). Ils aboutissent aux conclusions suivantes : les jumeaux se rencontrent sous deux aspects : séparés ou conjoints. Chez les types séparés, environ 25 % des paires ont une origine monozygotique et proviennent du clivage d'un embryon unique. Les autres paires proviennent du développement simultané soit de 2 sacs embryonnaires contenus dans le même ovule, soit de 2 cellules distinctes du sac. Les types conjoints, qui présentent une soudure partielle et une complète identité proviendraient du clivage incomplet d'un embryon (polyembryonie "par clivage") et non de la soudure partielle de 2 embryons initialement distincts.

C. HAPLOÏDIE et POLYEMBRYONIE

Compte-tenu des observations précédentes, il apparaît que l'induction de l'haploïdie dans les graines polyembryoniques n'est possible que dans quelques cas très limités de polyembryonie euploïde : développement apomictique d'une cellule du sac embryonnaire normal ou d'un sac supplémentaire. Généralement, l'occurrence de ces phénomènes n'est pas fréquente. MÜNTZING (1938) qui a étudié les degrés de ploïdie des jumeaux sur 11 genres différents publie les chiffres suivants : haploïdes 0,5 % - diploïdes 95,6 % - triploïdes 3,5 % tétraploïdes 0,1 % - aneuploïdes 0,3 %. Deux genres font cependant exception d'après WEBBER (1940), on rencontre parmi les graines gémellaires 25 % d'haploïdes chez Triticum et 50 % chez Gossypium. Ce taux peut même aller, d'après ROUX (1958) jusqu'à 80 % chez Gossypium barbadense sous forme de couples haploïde-diploïde.

Les chiffres donnés par RANDALL et RICK (1945) pour Asparagus officinalis sont du même ordre que ceux de MÜNTZING (1937) : parmi 393 graines contenant 2 embryons (222 du type séparé + 171 du type conjoint) les nombres chromosomiques individuels se répartissent selon le tableau suivant :

Tableau 3

Répartition des nombres chromosomiques chez les plantules jumelles

(d'après RANDALL et RICK, 1945)

Nombres chromosomiques individuels	% parmi les types séparés	% parmi les types conjoints
10 chromosomes	1,8	2,1
20 "	92,5	95,2
21 "	2,1	2,1
28 "	0,3	-
30 "	3,1	-
40 "	0,3	0,7

D'après HUNTER (1953), sur 21 paires observées chez l'Asperge, une était haploïde-haploïde, une était diploïde-tétraploïde et 19 étaient diploïde-diploïde.

L'Asperge se situerait donc parmi les espèces fournissant, chez les plantes jumelles, un pourcentage relativement élevé d'haploïdes, très éloigné toutefois des proportions constatées chez Triticum et Gossypium, et très insuffisant pour permettre la constitution d'une collection importante d'individus haploïdes, eu égard à la rareté constatée des graines polyembryoniques. Dans conditions, on peut se demander si les individus monoembryonnés ne constitueraient pas un matériel plus intéressant pour la recherche d'individus haploïdes.

Quelques exemples d'apparitions spontanées d'haploïdes dans des graines monoembryonnées sont cités par IVANOV (1938) chez diverses espèces de Gossypium, Nicotiana, Triticum et chez Lycopersicum esculentum Mill., Oryza sativa, Zeamays L. etc. mais les fréquences en sont faibles sauf chez Triticum monococcum L. où IVANOV (1938) signale 0,43 % chez une lignée et où BURNHAM (1962) cite le chiffre de 20 % chez un hybride intervariétal. SATINA et al. (1937) mentionnent des haploïdes spontanés chez Datura, NINAN et RAVEENDRANATH (1965) en ont trouvé chez Cocos nucifera L., ROUX et CHIRINIAN (1959) signalent en avoir repéré chez le Coton Upland (G. hirsutum) avec une fréquence faible mais cependant supérieure à celle des graines polyembryoniques chez cette espèce.

Les recherches que nous avons entreprises systématiquement sur des graines monoembryonnées d'asperge nous ont montré que ce matériel ne se prête pas à la recherche d'haploïdes : sur 500 graines examinées, aucun n'a été trouvé, ce qui permet de considérer la fréquence de l'haploïdie parmi ces graines comme très inférieure à celle que l'on observe chez les graines polyembryoniques.

Ces dernières constituent donc la seule source spontanée importante d'individus à n chromosomes.

D. COMPETITION ENTRE EMBRYONS MULTIPLES

La compétition entre partenaires est reconnue de façon générale par WEBBER (1940) comme responsable du faible pourcentage de germination chez les graines gemellaires. Chez les Gymnospermes, elle favorise l'embryon le mieux situé qui se développe seul, sauf chez Gingko (BUCHHOLZ, 1920) où plusieurs embryons germent. Chez Citrus (W) la mortalité des embryons augmente avec leur nombre dans une même graine et l'embryon gamétique est fréquemment éliminé par les

embryons nucellaires malgré sa position privilégiée. Selon TRAUB (1936), le nombre d'embryons capables de survivre est influencé par les conditions de milieu : la diminution de l'alimentation entraîne celle du nombre de graines polyembryoniques. La nature des éléments nutritifs reçus, la température, l'âge de la graine, son état de maturité et de siccité sont autant de facteurs qui peuvent contribuer à l'élimination de certains embryons. D'après MÜNTZING (1937), les triploïdes produits à partir de sacs non réduits seraient faibles soit parce que le sac haploïde occupe une position plus favorable, et est donc mieux nourri, soit parce que l'équilibre normal $2n, 3n, 2n$ entre embryon, albumen et tissu environnant est modifié en $3n, 5n, 2n$ dans un sac non réduit, ce qui gênerait la viabilité de l'embryon issu de ce sac. D'après RANDALL et RICK (1945) cependant, il n'y aurait pas de différence chez l'Asperge entre la taille d'un triploïde et celle de son jumeau diploïde et la compétition pour le développement, qui s'exerce entre les jumeaux, ne serait pas responsable par elle-même de différences de taille entre les partenaires ; le fait que, chez l'Asperge, la plantule haploïde est toujours plus petite que sa jumelle diploïde serait lié à son niveau de ploïdie qui la défavorise au début du développement ; la compétition avec une plante diploïde bénéficiant de phénomènes de superdominance, interviendrait alors mais de façon secondaire.

E. HEREDITE DE L'HAPLOÏDIE ET DE LA POLYEMBRYONIE

KAPPERT (1933) constate que, si le degré d'expression de la polyembryonie est modifié par les conditions de milieu (par la compétition en particulier), il est déterminé, à l'origine, par des facteurs génétiques : KAPPERT (1933) obtient des lignées de Lin fortement polyembryoniques à partir de croisements entre parents présentant ce caractère à un degré moindre et réussit, par sélection, à relever le taux de polyembryonie de 0,01-0,04 % à 8-9 %. Ce

caractère serait conditionné par une série de facteurs multiples chez le Lin comme chez divers autres genres tels que Citrus (W) et Oryza (W). Chez Capsica frutescens, CAMPOS et MORGAN (1960) montrent l'influence du génotype maternel sur le taux de polyembryonie et d'haploïdie par l'étude de croisements entre lignées obtenues par doublement du génome d'haploïdes d'une part, et lignées quelconques d'autre part. Chez le Maïs, CHASE (1949) montre que la tendance des gamètes à la parthénocarpie est contrôlée génétiquement. Selon COE (1959) le mâle utilisé joue également un rôle. En sélectionnant les parents mâle et femelle obtenus par doublement d'haploïdes, il parvient à augmenter considérablement la fréquence de l'haploïdie. Chez le Coton, d'après SILOW et STEPHENS (1944) l'apparition d'haploïdes chez des jumeaux serait d'origine maternelle. Une étude plus fine menée chez Parthenium argentatum A. Gray par GERSTEL et MISHANEC (1950) a montré que l'apomixie est sous contrôle génétique et que la sexualité est dominante sur l'apomixie. Cette observation rejoint celle de MÜNTZING (1937) sur Poa et se rapproche de celle de GUSTAFSSON (1947) sur Citrus. Chez l'Orge, RANA (1966) signale une mutation polyembryonique monofactorielle récessive (ne donnant que des diploïdes). Chez l'Asperge, la fréquence de la polyembryonie paraît influencée par le génotype de la plante mère mais l'étude de l'hérédité du caractère n'a pas été abordée par RANDALL et RICK (1945).

F. INTERET DE LA POLYEMBRYONIE

Ce caractère a été longtemps considéré comme accidentel et dénué d'intérêt mais de nombreux auteurs considèrent actuellement que la polyembryonie constitue la voie naturelle la plus apte à faire apparaître des individus polyploïdes ou haploïdes. Compte-tenu de l'importance prise par les

formes polyploïdes dans la diversification des espèces spontanées et cultivées et dans leur propagation (DARLINGTON, 1965), la polyembryonie apparaît donc comme un facteur important d'évolution et de répartition des espèces. D'autre part la possibilité d'utiliser les haploïdes pour obtenir des individus homozygotes constitue en génétique un moyen de travail non négligeable. A ce point de vue la polyembryonie peut être considérée comme un facteur de progrès pour l'amélioration des espèces cultivées.

Elle apparaît donc finalement, non plus comme un accident sans importance, mais bien comme une manifestation permanente du potentiel évolutif de certaines espèces végétales et plus particulièrement d'A. officinalis. A ce titre, elle devait retenir notre attention.

Chapitre III

RECHERCHES SUR L'HAPLOÏDIE CHEZ ASPARAGUS OFFICINALIS

Les raisons qui nous ont entraînés à rechercher les haploïdes chez Asparagus officinalis ont été exposées en introduction. Il est évident que l'utilisation de ces individus n'a d'intérêt que dans la mesure où nous en possédons un nombre suffisant pour disposer d'un large éventail de génomes. Il est donc nécessaire que nous nous assurions une collection nombreuse et variée d'individus haploïdes.

Les premiers travaux ont commencé en 1963 et les premiers haploïdes ont été isolés en fin d'année 1963. Le matériel végétal utilisé au départ était un stock de graines tout-venant d'une population commerciale de type Argenteuil. Par la suite, des lots d'origine connue ont été employés. Tous appartiennent au type Argenteuil.

A. RECHERCHE DE GRAINES POLYEMBRYONIQUES

1°) Méthodes

a) Sur graines germées

On fait germer des graines et on isole celles qui portent 2 racines. La nécessité de travailler sur des quantités de graines importantes ne permet pas la mise en germination sur papier buvard, méthode classique mais coûteuse en temps et en place. On peut observer de grandes quantités de graines en utilisant leur aptitude à germer sous l'eau aérée : les graines sont rapidement nettoyées par un passage à l'alcool à 70°, rincées à l'eau ordinaire, puis déposées

dans des Erlenmeyer de 0,5 l à raison d'environ 5.000 graines par flacon et recouvertes d'environ 250 cc d'eau du robinet. Une série de 4 à 6 Erlenmeyer dont les bouchons laissent passer une tubulure de verre et caoutchouc peut ainsi être branchée sur un générateur de bulles d'air du type utilisé pour le fonctionnement des aquariums d'appartement.

Le barbotage de l'air circulant d'un Erlenmeyer à l'autre, permet la germination des graines submergées dans des délais qui dépendent de la température ambiante mais qui sont de l'ordre d'une quinzaine de jours. La germination est échelonnée en raison de l'hétérogénéité des lots utilisés, ce qui nécessite plusieurs examens successifs.

Pour repérer les graines portant 2 racines, on verse le contenu du flacon avec précaution (pour ne pas briser les racines) dans un cristalliseur large et l'on passe en revue toutes les graines germées. Cet examen se fait sans difficulté et assez rapidement. Les graines portant 2 racines sont retirées du cristalliseur et placées sur papier buvard en boîte de Pétri dans une étuve à 25°. Les autres sont remises dans l'Erlenmeyer pour y poursuivre leur germination. Il arrive en effet que les deux embryons ne germent pas simultanément, ce qui entraîne une sortie retardée de la 2ème racine. On procède à un examen quotidien jusqu'à germination de l'ensemble du lot. Cette méthode permet, avec une série de 6 Erlenmeyer, de rechercher les graines polyembryoniques parmi environ 30.000 graines à la fois.

b) Sur graines non germées

On utilise une méthode inspirée des procédés courants de délintage du Coton. Les graines sont immergées dans l'acide sulfurique pur pendant 5 à 6 minutes puis rapidement égouttées et frottées énergiquement entre deux morceaux de toile grossière. Le tégument attaqué par l'acide est partiellement déchiré et

arraché au cours de cette manipulation qui doit se faire rapidement. Les graines sont immédiatement rincées à l'eau courante afin d'arrêter l'action de l'acide sulfurique. A ce stade, l'albumen dénudé est translucide et laisse voir par transparence 1 ou 2 ou plusieurs embryons. Le repérage des graines à 2 embryons se fait par examen d'une couche de graines sur fond noir sous éclairage. Les graines ainsi triées sont séchées à l'air et peuvent ensuite être stockées pendant quelques semaines avant d'être utilisées à la recherche des haploïdes.

2°) Avantages et inconvénients des deux méthodes -- Fréquences observées

La deuxième méthode permet la constitution de "réserves" de graines polyembryoniques disponibles à tout moment alors que la précédente nécessite l'examen des graines gemellaires dès leur repérage après germination.

D'autre part, par le procédé à l'acide, peut être appréciée la fréquence "réelle" d'occurrence des graines polyembryoniques alors que la première méthode ne permet de mesurer que la fréquence "observable" intéressant seulement les embryons multiples susceptibles de germer.

Le dénombrement de différents lots comportant, en tout, plus de 700.000 graines permet d'établir que la polyembryonie existe dans notre matériel avec une fréquence réelle moyenne de 3 %. (nous avons noté des taux variables de 0,8 % à 14,4 % selon les lots), tandis que la proportion de graines polyembryoniques observée par germination de lots comparables et appréciée sur un total de plus de 500.000 graines s'élève à 2 % en moyenne (avec des variations, selon les lots, de 0 à 4,6 %). On peut donc considérer que, vraisemblablement, une partie des embryons jumeaux ne germe pas et que le taux réel de polyembryonie est un peu supérieur à celui que l'on peut estimer par l'examen des graines germées.

Par contre, la germination des graines traitées à l'acide sulfurique est délicate : avec les procédés habituels (barbotage ou germination sur papier buvard) on obtient, dans la plupart des cas, des développements bactériens ou mycéliens et un très faible pourcentage de graines germées, de sorte qu'il paraît impossible d'appliquer ces procédés aux graines polyembryoniques repérée après traitement à l'acide sulfurique. On opère donc en conditions stériles : les graines sont désinfectées dans une solution de sublimé à 2 % pendant 3 minutes, rincées plusieurs fois à l'eau stérile, puis ensemencées dans des tubes sur un milieu stérile contenant :

solution de KNOP ⁽¹⁾	à 50 %	= 1.000 cc
agar-agar		= 8 g

Les tubes sont placés en étuve à 25° et la germination se produit rapidement (en 4 à 8 jours), mais seulement sur une partie des graines : nos observations permettent d'évaluer à 40 % environ le taux moyen de germination, ce qui ramène à 1,2 le nombre de graines polyembryoniques utilisables pour la recherche d'haploïdes pour 1.000 graines traitées. L'abaissement du taux de germination est sans doute dû en partie à la non-germination de certains embryons multiples et en partie au traitement par l'acide qui peut endommager les embryons situés trop près de la surface de l'albumen. Finalement, le rendement en matériel disponible pour la recherche des haploïdes est moins bon avec cette méthode qu'avec celle des barbotages.

Les fréquences observées pour l'ensemble des 2 méthodes sont exposées au tableau n° 4, page 52.

(1) Solution de KNOP :	eau distillée	1.000 cc
	(NO ₃) ₂ Ca,	4 H ₂ O 1 g
	NO ₃ K	0,25 g
	SO ₄ Mg,	7 H ₂ O 0,25 g
	PO ₄ H ₂ K	0,25 g

B. RECHERCHE D'HAPLOÏDES CHEZ LES GRAINES POLYEMBRYONIQUES

1°) Méthodes

La méthode employée a été mise au point pour permettre l'examen de très nombreuses graines avec le minimum de moyens. Elle doit donc :

- ne pas demander, pour chaque graine, de nombreuses manipulations coûteuses en temps et en personnel ;
- permettre des dénombrements chromosomiques très rapides ;
- n'autoriser aucune erreur dans le repérage de la graine correspondant à chaque méristème examiné.

a) Dispositif et technique cytologique

Pour observer par exemple 12 graines polyembryoniques, on dispose 2 séries A et B comptant chacune 12 tubes à fixation, numérotés de 1 à 12 dans les 2 séries. Les tubes A reçoivent le produit destiné au pré-traitement des méristèmes, les tubes B reçoivent de l'eau. Sur chaque graine polyembryonique en germination, obtenue par l'une ou l'autre méthode (barbotage ou culture en tube stérile), on prélève ensemble les méristèmes des racines (2 en général), lorsque celles-ci ont 0,5 à 1 cm de long, et on les place dans un tube de la série A. La graine correspondante est placée dans le tube de la série B portant le même numéro. Les tubes B sont placés en réfrigérateur à 4-5° pour stopper le développement des graines qui pourraient souffrir d'un séjour dans l'eau non aérée à la température du laboratoire. Les tubes A sont utilisés à la préparation des méristèmes en vue de l'examen cytologique. Le pré-traitement dans une solution d'hydroxy-8-quinoléine à 290 mg/litre dure 3 heures et est suivi, après rinçage, de fixation pendant une heure dans l'alcool acétique 3-1.

Les méristèmes sont ensuite rincés et conservés dans l'eau en réfrigérateur à 4-5°, où ils peuvent être conservés (ainsi que les graines correspondantes) pendant 3 ou 4 jours si nécessaire.

La coloration peut ensuite être faite par n'importe lequel des colorants nucléaires traditionnels. Toutefois, pour faciliter les examens en grande série, nous utilisons la coloration dite "à la nigrosine acétique" inspirée de la technique pratiquée au Laboratoire de Contrôle variétal de la Station d'Essais de Semences pour les dénombrements en série des chromosomes de Betterave : le méristème retiré de l'eau est légèrement broyé sur lame à l'aide d'une "aiguille-spatule". Une goutte de colorant est déposée, puis la lamelle est appliquée avec précaution et l'écrasement est achevé par tapotements secs sur la lamelle. L'excès de colorant est absorbé au buvard.

Préparation du colorant :	Lackschwarz extra ⁽¹⁾ (Bayer)	4 g
	Acide acétique	50 cc
	Eau distillée	50 cc

Porter à ébullition pendant 3 à 4 minutes. Filtrer après refroidissement.

La coloration obtenue n'est pas parfaitement propre mais elle colore les chromosomes en noir intense sur fond gris clair et permet leur repérage rapide.

La préparation d'une lame demande très peu de temps et permet, lorsque les mitoses sont nombreuses d'examiner un méristème en quelques minutes.

Le microscope utilisé est un Leitz du type Dialux. L'examen se fait au grossissement 1250 (oculaire 10, objectif à immersion 100). Le dénombrement exact n'est pas facile chez les individus diploïdes (pour Asparagus officinalis

(1) Le produit "Lackschwarz" est employé de préférence à la nigrosine car il donne des résultats strictement identiques et est moins coûteux.

$2n = 20$). La recherche d'haploïdes consiste avant tout à s'assurer que toutes les mitoses "lisibles" présentent 10 chromosomes. Les méristèmes présentant une ou plusieurs mitoses ayant plus de 10 chromosomes sont considérés comme "non haploïdes" et les graines correspondant à ces méristèmes sont éliminées immédiatement⁽¹⁾.

b) Contrôle sur plantule

La graine correspondant à un méristème supposé haploïde est retirée du réfrigérateur et plantée en godet dans la serre. Elle est porteuse de 2 embryons. Lorsque les 2 plantules se développent nous ignorons laquelle est présumée haploïde.

La détermination doit pourtant être faite rapidement afin d'éviter que la plantule diploïde n'exerce sur sa jumelle une compétition trop importante qui risquerait d'entraîner la mort de celle-ci. Il semble en effet que le développement d'un haploïde dans les conditions gemellaires soit freiné par celui du diploïde. Parfois même, l'haploïde ne se développe pas au-delà de la germination. Dans ce cas, une seule tige apparaît dans le godet et la vérification de son stock chromosomique montre qu'elle est diploïde. Dans d'autres cas, le départ en végétation est très lent si bien que la tige de l'haploïde est à peine sortie de terre lorsque son jumeau mesure 6 à 7 cm de haut. De façon générale, la plantule haploïde est presque toujours plus petite que sa jumelle. Il est donc probable lorsque deux tiges d'inégale longueur poussent à partir d'une graine polyembryonique que la plus haute est celle de la plante diploïde. On le vérifie en prélevant son bourgeon terminal. Cette opération en général n'est pas mortelle pour une plantule d'Asperge : le plus fréquemment elle

(1) Lorsqu'un méristème paraît présenter plus de 20 chromosomes, la graine correspondante est toutefois conservée pour vérification ultérieure de son niveau de ploïdie.

induit la ramification de la tige principale dont la croissance peut alors se poursuivre. Toutefois il serait imprudent de la pratiquer sur une jeune plante haploïde chétive dont les chances de survie sont inconnues a priori. Le bourgeon de la plante la plus grande est examiné selon une technique identique à celle qui est utilisée pour les méristèmes. La vérification du nombre de chromosomes permet de s'assurer qu'il s'agissait bien de la plantule diploïde.

Rarement l'haploïde est aussi grand que son jumeau. Dans ce cas on peut sans inconvénient prélever le bourgeon terminal de l'une des plantules au hasard car les dangers présentés par cette ablation sont minimes pour une plante haploïde lorsqu'elle présente une vigueur comparable à celle du diploïde jumeau.

Dans certains cas très rares, on a affaire à des triplets. Le prélèvement des bourgeons terminaux se fait alors selon les hauteurs relatives des 3 plantes, sur la plus grande ou sur les deux plus grandes.

Après avoir déterminé par dénombrement chromosomique quelle est la plante diploïde d'une paire, il faut procéder à sa suppression. Pour cela on déterre l'ensemble tiges, graine, racines à l'aide d'un jet de pissette à eau et l'on sépare les 2 individus en ayant soin de laisser le présumé haploïde attaché à la graine. Le diploïde est complètement supprimé sans difficulté. La plantule restante remise en terre et débarrassée de toute concurrence se développe ensuite avec une vigueur très variable selon les cas. Dès qu'elle compte 2 ou 3 tiges, on peut sans inconvénient prélever l'un de ses bourgeons pour vérifier le nombre de ses chromosomes. C'est seulement après cette vérification que l'on peut confirmer qu'il s'agit d'un haploïde.

2°) Fréquence observée

Comme pour l'étude de la polyembryonie, il faut distinguer la fréquence "réelle" d'haploïdie parmi les paires d'embryons jumeaux développées à l'intérieur des ovules, et la fréquence "observée" chez la même population, qui concerne seulement les haploïdes susceptibles de germer et ne reflète pas forcément d'une façon exacte la fréquence réelle.

Aucune méthode ne permet à notre connaissance d'apprécier la fréquence "réelle" d'haploïdie. On peut toutefois penser que les embryons haploïdes, en raison de l'unicité de leur génome ne sont pas toujours capables de se développer. Dans ce cas, la graine polyembryonique ne présente lors de sa germination qu'une seule racine (celle de la plantule diploïde). Elle est considérée comme une graine normale et échappe à nos dénombrements. Ces non-germinations d'haploïdes pourraient être en partie responsables du léger écart observé entre les proportions de graines polyembryoniques obtenues par les deux méthodes de prospection exposées plus haut.

L'ensemble des fréquences de polyembryonie et d'haploïdie observées pour chaque lot de graines figure au tableau 4.

Le taux moyen de polyembryonie pour l'ensemble des populations observées n'est calculé que sur une partie du matériel car certains lots de graines n'ont pas été dénombrés au départ. On peut l'évaluer à environ 2,6 %.

Il est impossible de chiffrer en "pour mille" le taux d'haploïdie des diverses séries de graines polyembryoniques composant chaque lot, chaque série comportant des effectifs trop faibles. Dès que l'on a affaire, en groupant les séries homologues de chaque lot, à des effectifs de l'ordre de quelques centaines, l'appréciation devient possible et conduit à des taux d'haploïde

Tableau 4

Fréquences observées de polyembryonie et d'haploïdie

Origine des lots de graines	Graines polyembryoniques		Nombre d'haploïdes			
	Fréquence des germées (disponibles pour la recherche d'haploïdes) pour 1000 graines	Nombre de germées utilisées à la recherche d'haploïdes	trouvés	restés vivants	% polyemb examinés	% graines totales (y compris les non germées)
Imprécise (commerce)		1.285	19	3	15	
Un lot commercial connu	1,6	794	19	5	24	0,040
Plantes en mélange descendant de 12 croisements contrôlés		470	9	3	19	
12 lots de plantes descendant chacun d'un croisement contrôlé	3,0	1.132	17	12	15	0,063
Plantes isolées de lots commerciaux connus	1,8	698	12	2	17	0,035
Plantes isolées descendant de croisements contrôlés	2,1	521	9	3	17	0,035
Totaux et moyennes	2,6 *	4.890	85	33	17	0,039 *

* Evaluation partielle ne portant que sur les lots préalablement dénombrés.

pour 1.000 graines polyembryoniques allant de 15 à 24 selon les lots. La fréquence moyenne observée est de 17 haploïdes pour 1.000 graines polyembryoniques soit 39 haploïdes pour environ 10^6 graines examinées au départ. En se référant aux appréciations fournies par RANDALL et RICK, 1945, on constate que la fréquence moyenne de polyembryonie observée par ces auteurs (0,95 %) est très supérieure à celle que nous avons observée 2,6 %. En particulier, le chiffre de 3,54 % obtenu par ces auteurs sur un lot commercial de type Argenteuil, n'a jamais été atteint parmi nos populations et dépasse très largement notre maximum de 14,4 % obtenu exceptionnellement sur une plante isolée d'un lot commercial.

Par contre, les proportions d'haploïdes rencontrées parmi les graines polyembryoniques sont comparables dans le matériel utilisé par RANDALL et RICK (1,8 à 2,1 %) et dans le nôtre (17 %).

Nous avons trouvé au total 85 haploïdes après avoir examiné plus de 100 kg de graines. Sur ces 85 cas d'haploïdie, 5 correspondent à des couples d'haploïdes issus soit d'une même paire (dans 4 cas) soit d'un triplet : groupe de 3 embryons (dans un cas : 1 diploïde-2 haploïdes). Dans les 75 autres cas, il s'agit de paires 1 diploïde-1 haploïde.

Les cas de polyploïdie ou d'aneuploïdie n'ont été retenus qu'au début de nos recherches car leur repérage ralentit beaucoup le rythme des comptages chromosomiques : on reconnaît facilement un méristème à 10 chromosomes alors que la détermination précise d'un nombre de chromosomes supérieur à 20 est délicate. Au cours des premiers mois de cette étude, nous procédions au dénombrement de tous les chromosomes et avons ainsi trouvé un triploïde qui a été conservé (dans une paire diploïde - triploïde).

Tous les individus haploïdes repérés relèvent obligatoirement du type "complexe" de polyembryonie exposé plus haut et correspondent donc à des

développements apomictiques de gamètes, soit dans un sac embryonnaire unique, soit dans un sac supplémentaire. Sur les 5 cas où deux haploïdes jumeaux ont été observés, 2 couples ont survécu. Chez ces 2 couples, les deux plantes sont strictement identiques. Il peut donc y avoir eu soit clivage d'un embryon haploïde développé par apomixie à partir d'une cellule du sac (en présence d'un noyau secondaire fécondé) soit développement simultané de deux cellules du sac dans les mêmes conditions apomictiques. Que l'on ait affaire à l'une ou l'autre de ces origines ne change d'ailleurs rien à la constitution génomique des embryons. La possibilité du développement, sans fécondation, de gamètes appartenant à deux sacs distincts est exclue en raison de l'identité complète des jumeaux.

C. ASPECTS PHENOTYPIQUES DES INDIVIDUS HAPLOÏDES

1°) Viabilité

Le développement des haploïdes est souvent difficile. Après la plantation d'une graine germée porteuse de plusieurs embryons dont l'un est présumé haploïde, il arrive, nous l'avons vu, qu'une seule tige se développe ; la vérification du niveau de ploïdie de cette tige montre qu'il s'agit toujours de la plantule diploïde. La plantule présumée haploïde a donc disparu. Au cours de nos travaux, nous avons ainsi observé 17 cas de mort rapide des plantules (sans sortie de tigelles), ce qui représente la perte de 20 % des plantes présumées haploïdes. Il paraît impossible de savoir combien de ces plantes auraient pu survivre si elles n'avaient pas été soumises à la concurrence éliminatoire de la plantule jumelle pour l'utilisation des réserves de la graine.

Cette concurrence se fait encore sentir au-delà du repiquage car les plantules vivent pendant quelque temps aux dépens de l'albumen : celle qui est

présumée haploïde connaît une période difficile de 2 à 3 semaines au cours desquelles elle développe lentement une tige souvent grêle et courte tandis que sa jumelle croît rapidement et doit être supprimée le plus tôt possible.

Aussitôt après l'ablation, la plantule restante est replantée : libérée de toute compétition externe, elle peut accélérer son rythme de croissance. Cependant, il arrive qu'elle reste faible, ne parvienne pas à surmonter le deuxième repiquage et meure quelques jours après la suppression de sa jumelle. Nous avons observé 31 cas de mortalité de ce type (au cours du premier mois qui suit la levée) qui correspondent à la perte de 35 % des plantes présumées haploïdes. Au total environ 55 % des haploïdes mis en évidence par nos observations ont disparu au cours du premier mois qui a suivi leur dépistage.

Lorsque la plante franchit le cap du deuxième repiquage, elle émet sa seconde tige dans le courant du mois suivant. On peut alors la considérer comme définitivement viable.

Nous n'avons jamais observé de cas de mortalité autres qu'accidentel au-delà du 2ème mois ; en définitive, nous pouvons évaluer à environ 45 % la viabilité des individus haploïdes issus de graines polyembryoniques dans nos populations de type Argenteuil.

RANDALL et RICK (1945) qui signalent avoir trouvé 10 haploïdes ne donnent aucun renseignement sur leur viabilité.

HUNTER (1953) signale que les 2 haploïdes jumeaux obtenus sur 21 graines polyembryoniques, ont vécu plusieurs années.

Parmi les autres genres, il ne semble pas qu'une estimation de la viabilité des individus haploïdes issus de graines polyembryoniques ait été donnée.

2°) Morphologie

Chez la plupart des espèces où des haploïdes ont été observés, les auteurs s'accordent généralement⁽¹⁾ pour considérer que le type haploïde est une reproduction réduite du type diploïde (IVANOV, 1938).

Avant d'aborder la question de la morphologie des haploïdes chez Asparagus officinalis, il faut rappeler l'extrême variabilité qui caractérise l'espèce pour tous les caractères. Des mensurations effectuées sur de jeunes plantes en pépinière et sur des plantes adultes montrent que le coefficient de variation individuelle⁽²⁾ à l'intérieur d'une population d'âge donné est fréquemment supérieur à 25 pour le nombre des tiges et supérieur à 15 pour leur calibre et leur hauteur. Cette hétérogénéité se retrouve au niveau haploïde de sorte qu'il est aussi difficile de considérer "l'ensemble des haploïdes" que "l'ensemble des diploïdes" ou de comparer un haploïde quelconque avec un diploïde quelconque tiré de la même population.

Les conditions de milieu jouent d'autre part un rôle capital dans le développement des plantes et modifient largement leur aspect phénotypique. A c

(1) Toutefois, VASILYEV (1936) signale que chez Triticum durum des haploïdes ont la même hauteur que les diploïdes et GAINES et AASE (1926), chez Triticum compactum Host. ne trouvent aucune différence morphologique entre haploïdes et diploïdes.

(2) Coefficient de variation individuelle = $\frac{S}{\bar{m}} \times 100$

S = écart type

$\bar{m}$ = valeur moyenne

propos, il faut signaler que, pour contrôler tout doublement spontané de génome qui pourrait éventuellement intervenir sous l'effet des conditions externes, des vérifications du nombre chromosomique sont effectuées périodiquement sur l'ensemble de la collection environ deux fois par an. Aucun doublement spontané n'a jamais été observé.

Les observations phénotypiques portent sur des plantes âgées de 2 à 3 ans, élevées en serre chaude (16 heures de jour à 28° + 8 heures de nuit à $18-20^{\circ}$) avec, dans la journée, un complément de lumière artificielle de 1.000 à 1.500 lux et une hygrométrie de 70-80 % contrôlée par humidostat.

a) Hauteur

Parmi les 33 plantes haploïdes de notre collection, 3 sont toujours restées basses. Leur hauteur n'excède pas 60 cm en 2ème année de culture. Leurs tiges sont grêles (quelques millimètres de diamètre) et peu nombreuses (5 à 6).

Par contre, 5 plantes ont atteint une hauteur équivalente ou supérieure à celle de plantes diploïdes du même âge. Elles ont des tiges vigoureuses de diamètre voisin de 10 mm, souvent nombreuses (jusqu'à 10 tiges) et hautes de 1,50 m à 2 m.

Plus nombreuses sont les plantes moyennement développées dont les tiges n'excèdent pas 0,90 m à 1,20 m de haut et 5 à 6 mm de diamètre. Ces tiges sont en nombre très variable selon les plantes et parfois très nombreuses (jusqu'à 30 tiges).

b) Système racinaire

Il semble, en général, pour les plantes en pots, élevées en serre, que la hauteur des tiges soit liée à l'importance du système racinaire (étant entendu que ce dernier n'est jamais entravé par les dimensions du pot dans

lequel la plante est cultivée, ce qui nous amène tous les 4 à 6 mois environ à repoter les plantes vigoureuses dans des pots plus grands. Pour le système racinaire, comme pour les tiges, on constate une grande variabilité d'un haploïde à l'autre, de sorte que, chez certains individus vigoureux, le volume de l'appareil souterrain paraît comparable et parfois supérieur à celui de plantes diploïdes.

c) Cladodes

Les organes assimilateurs qui, chez le genre Asparagus, sont des cladophylles ou cladodes, se présentent chez Asparagus officinalis sous forme d'aiguilles plus ou moins flexueuses, de longueur variable selon le niveau d'implantation sur les rameaux principaux et selon la plante considérée. Dans la plupart des cas, ces cladodes, chez les haploïdes, ne dépassent guère 1 centimètre de long mais, pour ce caractère comme pour les précédents, la variabilité individuelle est grande (photo n° 5). Il faut, d'autre part remarquer que la longueur des cladodes ne paraît en aucune façon liée avec la hauteur des tiges ou leur diamètre.

En résumé, chez cette espèce, les différences de constitution génomique sont telles entre plantes qu'elles peuvent masquer les différences imputables à leur état haploïde ou diploïde. Ceci se traduit par l'existence de plantes haploïdes plus vigoureuses, ou à cladodes plus longs, que certaines plantes diploïdes portant d'autres génomes.

On peut séparer ces deux facteurs en supprimant l'un d'eux ; on éliminera les différences liées à la constitution génomique des plantes en comparant un haploïde avec la plante diploïde portant le même génome en deux exemplaires.



Photo n° 5 Diversité de dimensions des cladodes chez quatre individus haploïdes
(x 0,6)



Photo n° 6
Plantes diploïde et haploïde homologues: à gauche = $2n$ (x 1/20)
à droite = n

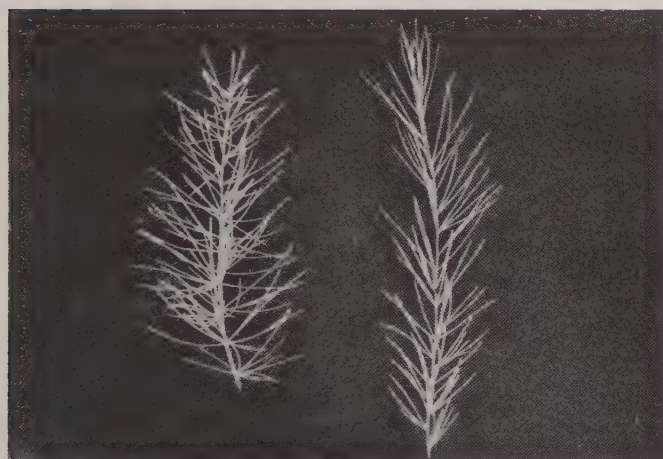


Photo n° 7 Cladodes diploïdes et haploïdes homologues (longueurs comparables) (x 0,6)
à gauche = $2n$
à droite = n

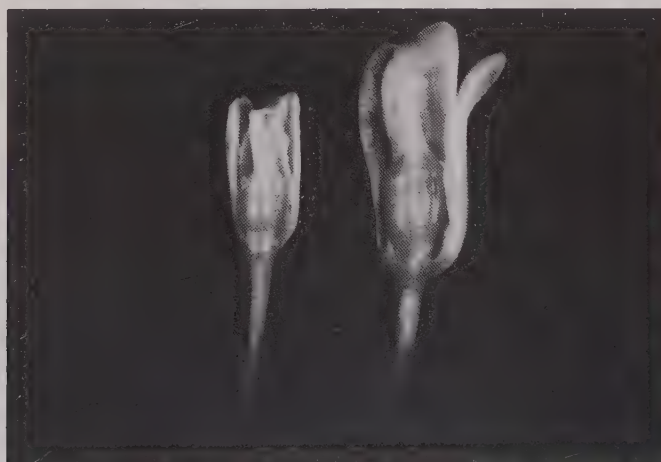


Photo n° 8 Fleurs haploïde et diploïde homologues
à gauche = n à droite = $2n$ (x 6,5)

Nous avons tenté cette comparaison sur 15 haploïdes dont nous avons réussi à doubler le génome pour en faire des diploïdes homozygotes ; nous avons constaté que le diploïde est toujours plus "vigoureux" (hauteur, nombre et calibre des tiges) que l'haploïde correspondant (photo n° 6) et que ses cladodes sont plus longs, sauf dans un cas où l'haploïde présente des cladodes très développés identiques à ceux du diploïde homologue (photo n° 7). On peut considérer, finalement, que toutes conditions égales, et pour un génome donné, l'état haploïde entraîne une réduction de l'ensemble de l'appareil végétatif (sauf, exceptionnellement, pour la longueur des cladodes qui peut être la même chez les individus à n ou à $2n$ chromosomes), ce qui rejoint les observations faites sur les autres genres.

En raison de l'hétérogénéité des populations, il ne saurait toutefois être question de reconnaître, d'après son aspect phénotypique, un individu haploïde parmi des diploïdes de génomes divers. Le phénotype peut seulement être utilisé pour distinguer le type haploïde du diploïde portant le même génome. En l'absence de toute lignée fixée, de tels groupes d'individus homozygotes n'existent pas à l'état naturel, ce qui explique que la recherche des haploïdes ne puisse être entreprise par la voie d'études macroscopiques.

3°) Etudes microscopiques

Il peut être intéressant de rechercher les haploïdes par des examens microscopiques plus rapides que le comptage des chromosomes. Chez divers genres (Solanum, Gossypium, Beta) on détermine le degré de ploïdie des euploïdes par la mensuration des cellules de garde des stomates ou par l'étude des chloroplastes.

a) Stomates

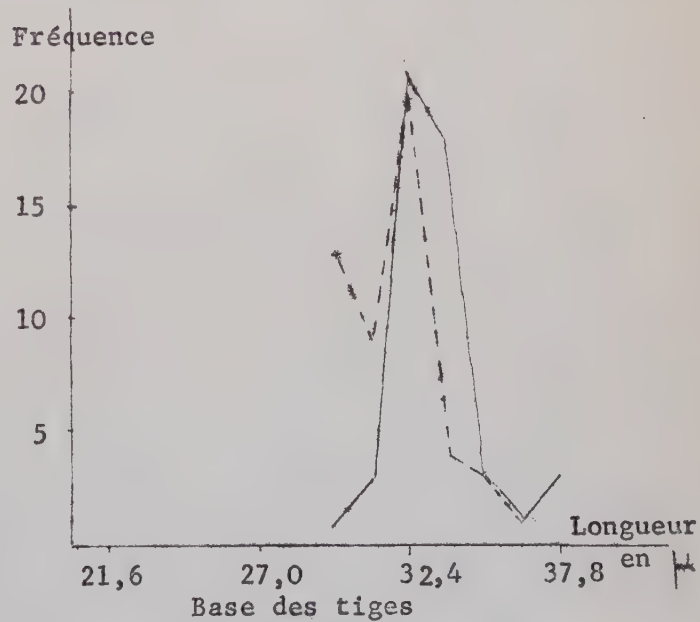
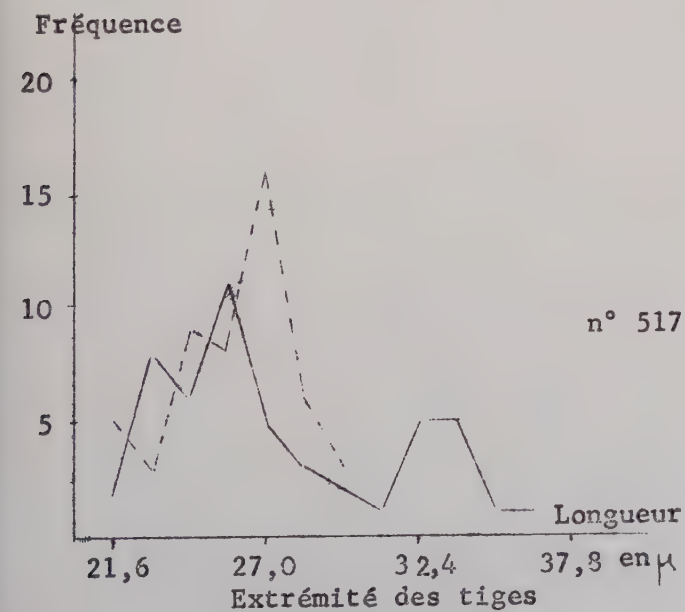
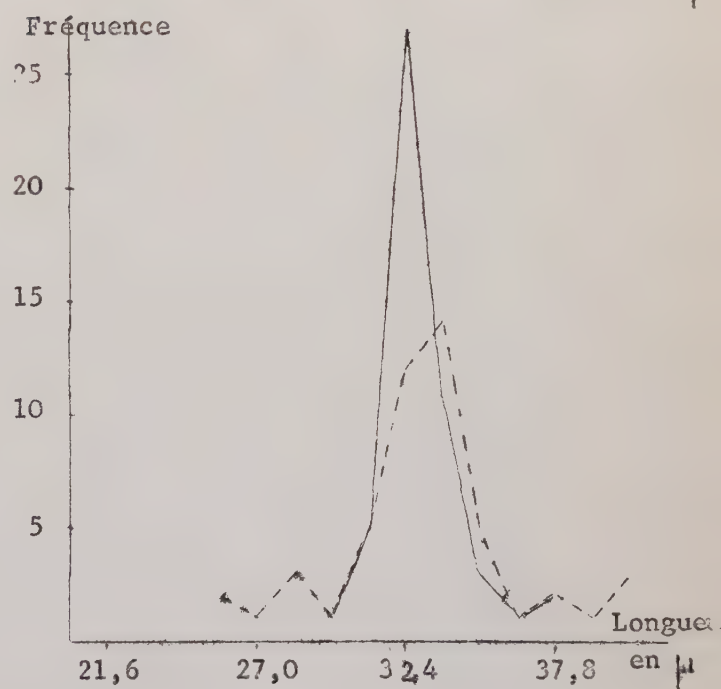
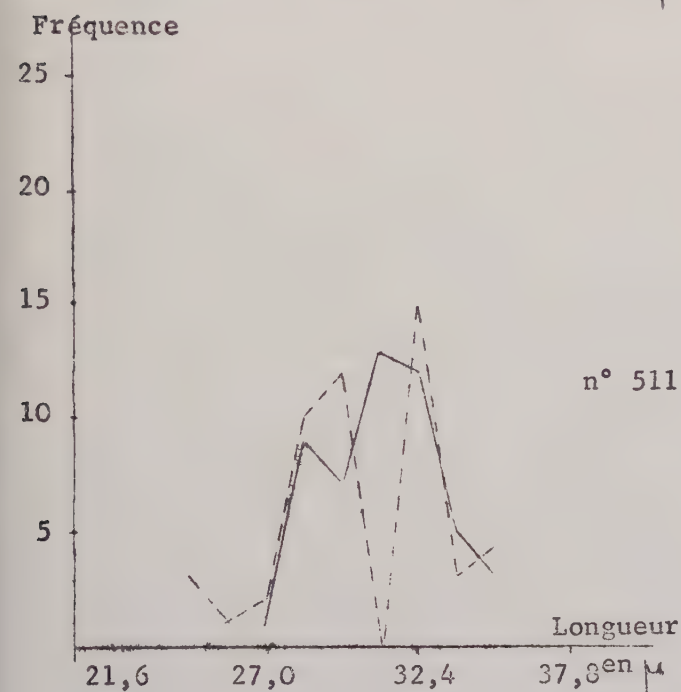
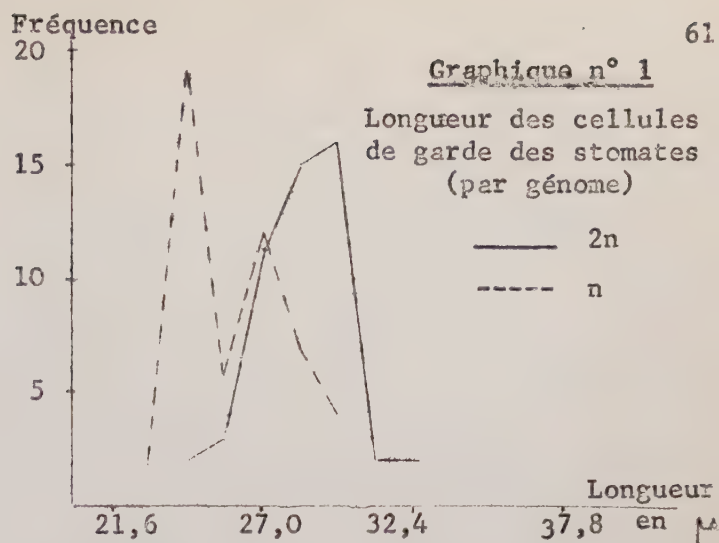
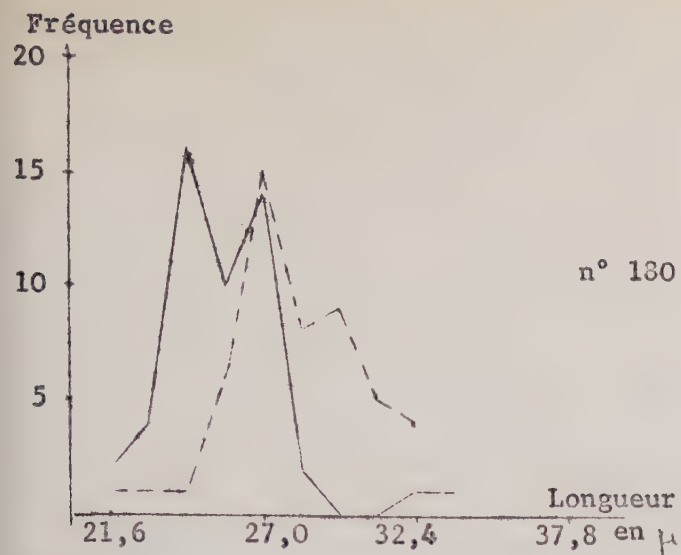
Chez Asparagus officinalis, nous avons mesuré les longueurs des cellules de garde des stomates de 3 plantes haploïdes et des diploïdes correspondantes. Les prélèvements de lambeaux d'épiderme sont effectués à deux niveaux différents (extrémité et base de la tige principale). Le matériel est coloré directement au Lackschwarz. Les graphiques n° 1 et 2 résument l'ensemble des observations. Le graphique n° 1 fait ressortir que, pour chaque génome, les cellules de garde ont des longueurs extrêmement variables aussi bien chez le diploïde (courbes en traits pleins) que chez l'haploïde (courbes en pointillés) leur longueur varie de 21,6 à 37,8 microns et que, pour ^{un} génome donné, les courbes correspondant aux deux degrés de ploïdie se chevauchent pour un même niveau de prélèvement. Si l'on regroupe les données concernant les stomates de plusieurs plantes de génomes divers (graphique n° 2), le chevauchement des courbes, pour les individus respectivement haploïdes et diploïdes, est complet.

Ces observations montrent que la longueur des stomates ne saurait être considérée comme un caractère discriminant, permettant le dépistage des haploïdes au sein d'une population diploïde, ni l'appréciation du niveau de ploïdie de diverses plantes de même génome.

b) Chloroplastes

Pour leur étude, nous prélevons le long des tiges, vers leur extrémité exposée à la lumière, des lambeaux d'épidermes qui se détachent aisément. La coloration est faite selon la technique signalée par ESSAD et TOUVIN (1959) montage dans une solution à 1 % de nitrate d'argent renforcée par un révélateur photographique "dur".

La mensuration des chloroplastes dans les cellules épidermiques de l'extrémité de la tige conduit à des valeurs variant entre 4 et 9 microns pour



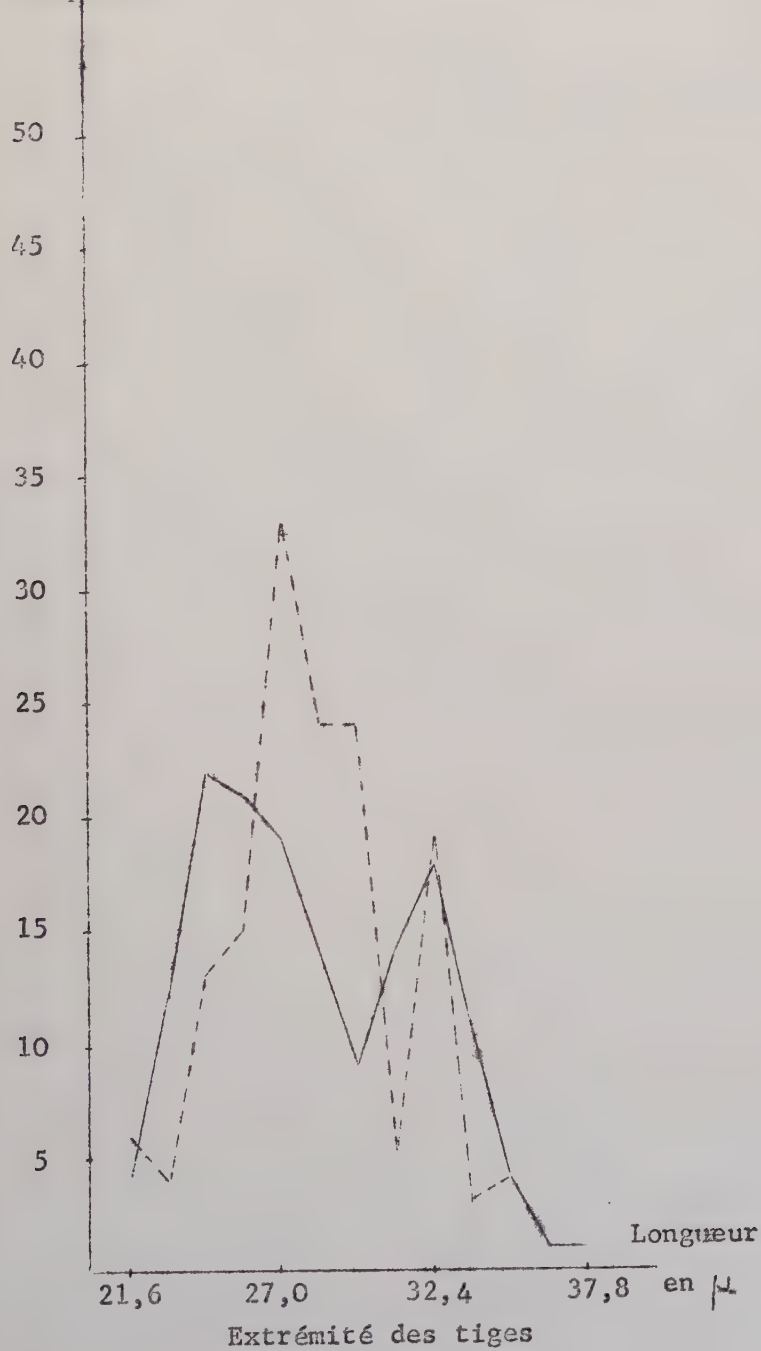
Graphique n° 2

Longueur des cellules de garde
des stomates

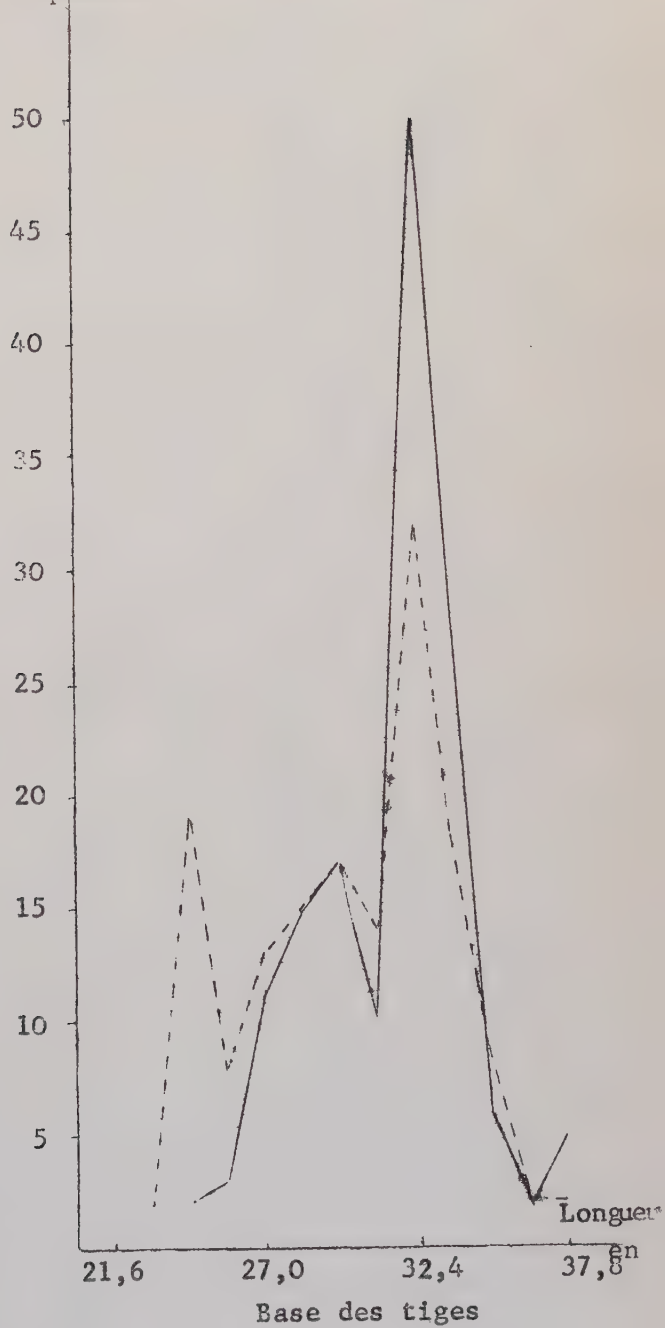
— 2n

- - - n

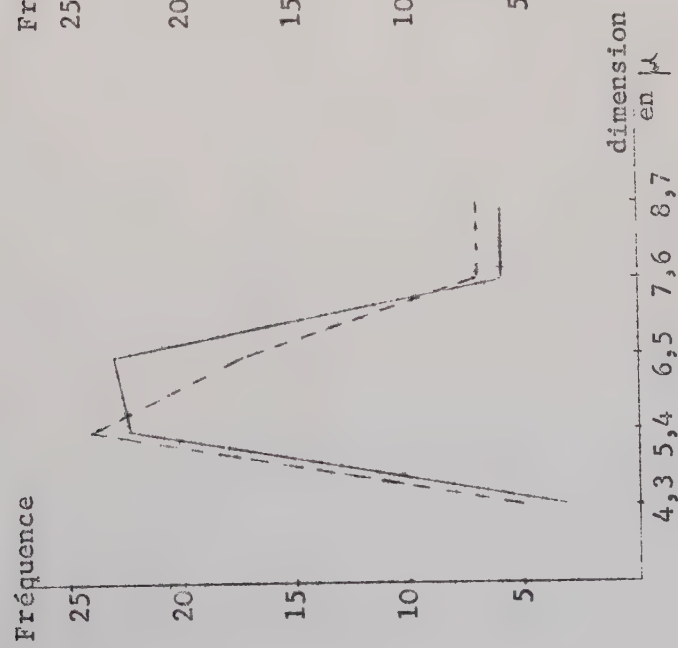
Fréquence



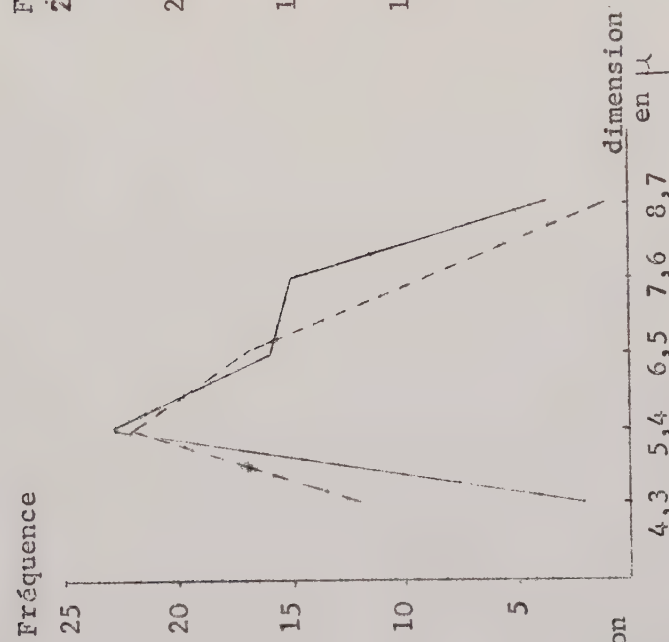
Fréquence



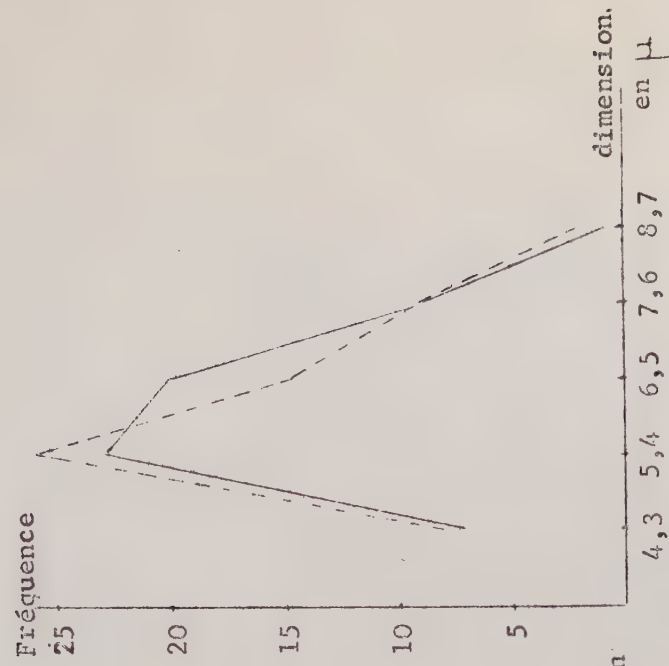
n° 517



n° 511



n° 130



Graphique n° 3

Dimension des chloroplastes dans les cellules
épidermiques de la tige
(par génome)

— $2n$
- - - n

Fréquence

Graphique n° 4

Dimension des chloroplastes dans les cellules
épidermiques de la tige

— 2n

- - - n

70

65

60

55

50

45

40

35

30

25

20

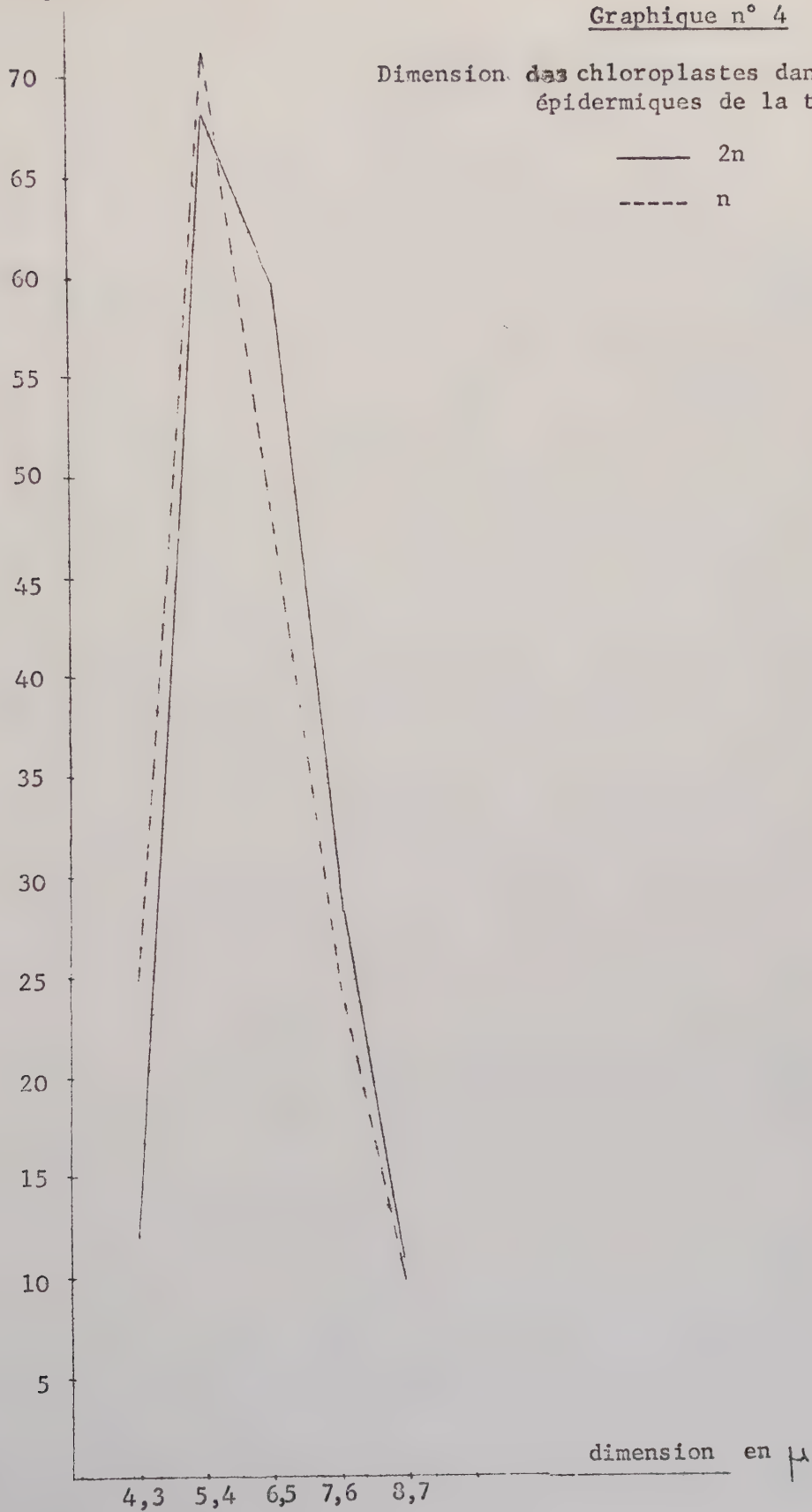
15

10

5

dimension en μ

4,3 5,4 6,5 7,6 8,7



Fréquence.

10

Graphique n° 5

Nombre de chloroplastes dans les cellules
de garde des stomates (par génome)

n° 180

— 2n

- - - n

Nombre de
chloroplastes

Fréquence

10

n° 517

Nombre de
chloroplastes

Fréquence

10

n° 929

Nombre de
chloroplastes

Fréquence

10

n° 511

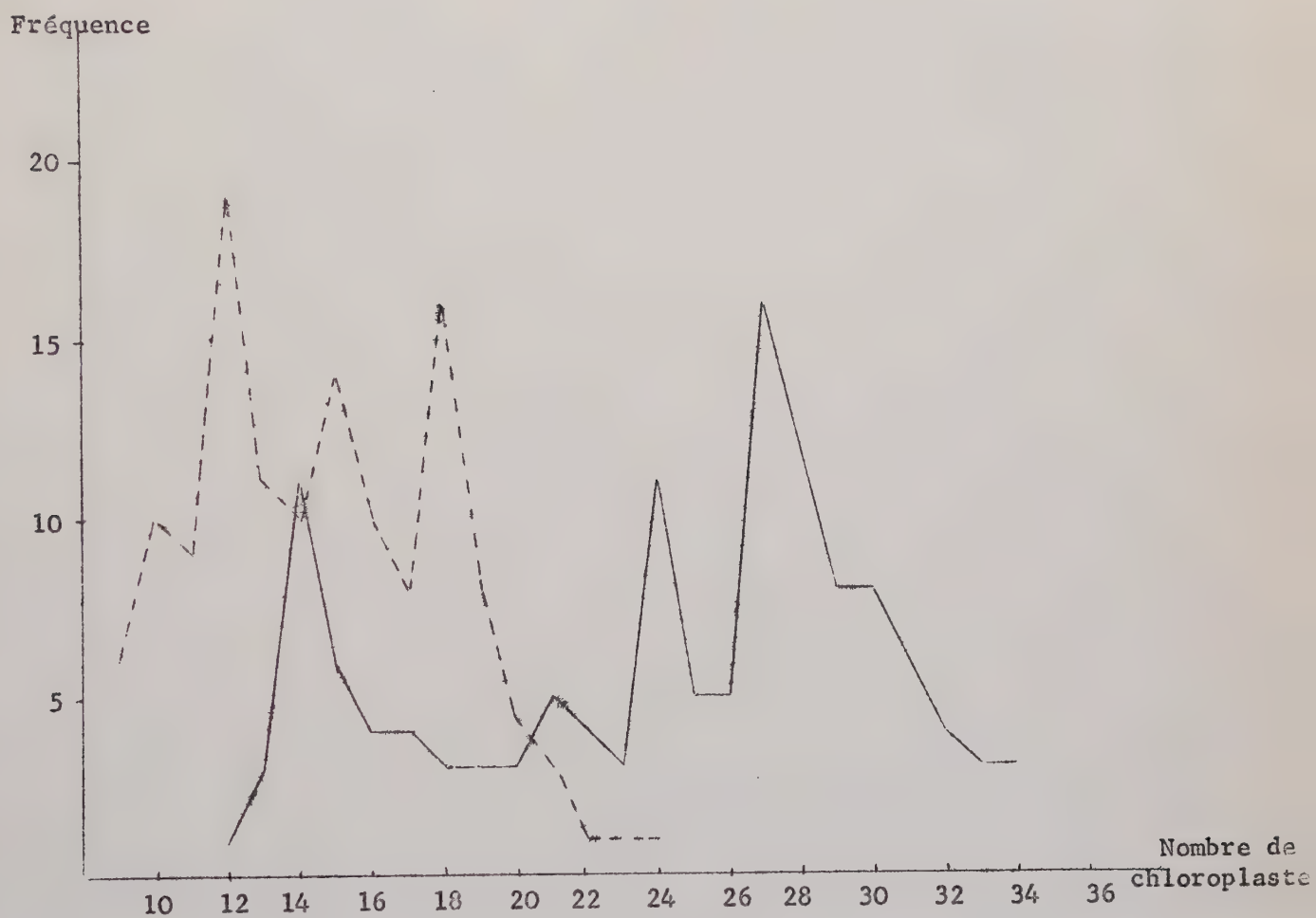
Nombre de
chloroplastes

Graphique n° 6

Nombre de chloroplastes dans les cellules
de garde des stomates

—— 2n

----- n



chacun des trois génomes observés et pour les deux niveaux de ploïdie (graphique n° 3). Les fréquences globales pour l'ensemble des trois génomes sont distribuées selon deux courbes (n et $2n$) qui se chevauchent complètement (graphique n° 4). La mensuration des chloroplastes dans les cellules épidermiques ne permet donc aucune distinction entre haploïdes et diploïdes.

La numération des chloroplastes dans les cellules de garde des stomates, considérée sur *Betterave* comme un procédé utilisable pour la détermination du niveau de ploïdie conduit à des résultats plus intéressants étudiés sur 4 génomes différents : pour chacun des génomes observés, on constate chez les diploïdes une supériorité nette du nombre de chloroplastes par rapport aux haploïdes correspondant. Les représentations graphiques (graphique n° 5) des fréquences observées ne se chevauchent pas du tout pour trois des génomes et à peine pour le quatrième. On peut donc considérer que ce caractère peut permettre de distinguer pour un génome donné l'haploïde du diploïde. Par contre, d'un génome à l'autre, la variation du nombre de chloroplastes est telle que l'haploïde de l'un présente des chloroplastes plus nombreux que le diploïde de l'autre. Les graphiques de fréquences groupées (graphique n° 6), pour les diploïdes d'une part et pour les haploïdes de l'autre montrent que le chevauchement est total et qu'il serait vain d'espérer utiliser le dénombrement des chloroplastes pour repérer des haploïdes au sein des populations.

Il apparaît finalement que le dénombrement des chromosomes est la seule technique cytologique permettant ce travail. Le principal inconvénient de cette méthode, qui par ailleurs ne présente pas de grandes difficultés, est qu'elle exigerait la collaboration d'un personnel spécialement formé si l'on voulait multiplier le nombre des observations.

D. APTITUDE DES HAPLOÏDES A LA REPRODUCTION

Les manifestations sexuelles chez un individu haploïde de n'importe quelle espèce peuvent, au même titre que les autres caractères, être plus ou moins perturbées du fait de l'unicité du génome.

1°) Floraison

Les pièces florales peuvent subir des modifications, en particulier dans leurs dimensions : WEBBER (1940) signale chez Gossypium barbadense la réduction de la taille des fleurs, notée aussi par ROUX et CHIRINIAN (1959) sur Gossypium hirsutum et par IVANOV (1938) sur Nicotiana rustica L. Chez Asparagus officinalis, l'apparition de fleurs n'est pas générale. Sur 33 haploïdes qui tous sont âgés d'au moins 2 ans, donc susceptibles de fleurir en serre, 6 seulement ont produit des fleurs morphologiquement bien constituées mais de dimensions réduites (photo n° 8). Il est impossible de savoir si les 27 autres haploïdes fleuriront plus tard mais la proportion élevée de plantes non fleuries jusqu'ici témoigne de l'importance des perturbations dues à l'état haploïde. Quatre de ces plantes ont, à diverses reprises produit des boutons floraux dont aucun n'a atteint un développement complet bien que les plantes aient été placées dans des conditions de température, d'éclairement et de nutrition généralement favorables à la floraison.

2°) Sexe

Asparagus officinalis est la seule espèce dioïque où des cas d'haploïdie aient été signalés. Le sexe des haploïdes chez cette espèce n'est pas connu a priori. Lorsque ces plantes sont issues de graines polyembryoniques récoltées sur des plantes femelles (déterminées, on l'a vu, par les allèles mm) elles ne

peuvent porter que le facteur *m* à l'état unique. Les six individus dont nous avons observé la floraison ont produit exclusivement des fleurs femelles, ce qui confirme le déterminisme de ce sexe, non par la présence du facteur *m* à l'état homozygote, mais bien par l'absence du facteur *M*.

3°) Fertilité

Toutes les publications relatives à l'étude des haploïdes chez divers genres, font unanimement état d'une stérilité importante ou totale de ces plantes, bien prévisible en raison des anomalies de méiose qu'entraîne l'unicité du stock chromosomique. Toutefois, il apparaît occasionnellement quelques graines sur les haploïdes de Capsicum annuum L. (CHRISTENSEN et BAMFORD 1943, POCHARD, publication en cours). Sur une plante haploïde de la variété Doux long des Landes multipliée par bouturage et isolée de tout autre piment, cet auteur a obtenu 4.397 graines pour 1.896 fruits, soit 2,3 graines par fruit en moyenne. Ce résultat est obtenu malgré une asyndèse totale à la méiose. Les plantes issues de ces graines ont des nombres chromosomiques qui varient de 24 à 38, la majorité étant à 24 chromosomes et identique à la variété d'origine. Chez Gossypium barbadense certains haploïdes sont aussi partiellement fertiles (ENDRIZZI, 1966). Chez Asparagus officinalis, la stérilité est à peu près totale. Nous avons obtenu 1 graine sur une plante et 2 sur une autre, après pollinisation par un pollen de plante diploïde. Les plantes issues de ces graines sont diploïdes et normales.

L'étude des méioses chez les haploïdes d'Asperge est rendue délicate en raison du sexe femelle de ces plantes : l'étude de la division hétérotypique est à peu près irréalisable sur les rares mégasporocytes et celle des cellules mères du pollen risque d'être perturbée du fait que les anthères des

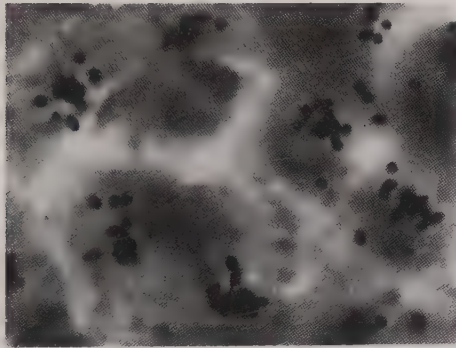
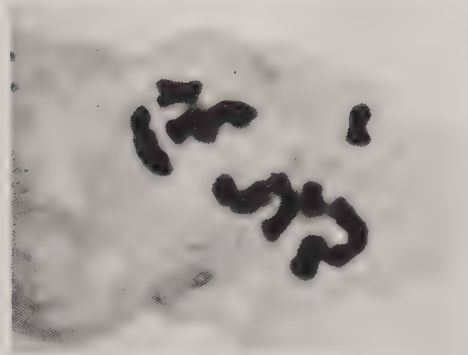
fleurs femelles sont vouées à l'avortement.

Chez les plantes ne donnant que des boutons avortés, aucune méiose n'est visible et il semble que l'avortement des étamines^{se} produise avant le stade de la division réductionnelle.

Chez les plantes capables de produire des fleurs épanouies, les étamines montrent des divisions jusqu'à la télophase I (photo n° 9), où l'on peut constater la présence de 10 univalents et la ségrégation inégale de ceux-ci entre les pôles. A la différence de ce que l'on observe couramment dans les étamines de plantes femelles diploïdes, nous n'avons jamais observé les étapes de la division II, mais nous ignorons si les divisions sont réellement bloquées après la télophase I par suite de l'état haploïde ou si, en raison de leur rareté nous n'avons pas observé un nombre de fleurs suffisant pour rencontrer le stade "tétrades" observable chez les diploïdes. Chez quelques espèces, la division II se produit pourtant malgré l'état haploïde : HUMPHREY (1934) signale avoir observé chez une Tomate haploïde la formation de sporades de tailles inégales après une ségrégation aléatoire à la division I observée dans la plupart des cas. De même HOLLINGSHEAD (1930) signale chez un haploïde de Crepis la formation en division II de micronucléi.

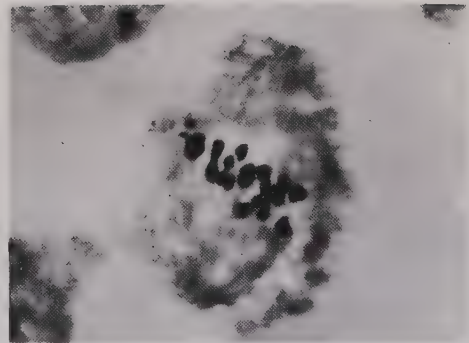
Chez l'Asperge, dans le cas des fleurs fertiles exceptionnelles citées plus haut, il est vraisemblable qu'une régulation de méiose s'est produite au niveau du mégasporocyte. La ségrégation 10-0 des chromosomes vers les deux pôles lors de la télophase I étant peu probable (probabilité = $\frac{1}{1032}$) on peut invoquer soit la formation d'un noyau de restitution comme HUMPHREY (1934) en a observé dans quelques cas sur Tomate, soit plus simplement, la suppression de la division réductionnelle, donnant naissance à des gamètes non réduits, de constitution normale, comme en ont observé BELLING et BLAKESLEE (1927) sur Datura et LESLEY et FROST (1928) sur Matthiola incana L.

Photo n° 9 10 univalents chez
un haploïde (Télophase I) →
(x 2450)



← Photo n° 10 Asyndèse partielle chez
une plante diploïdisée
peu fertile (Metaphase I)
(x 1000)

Photo n° 11 10 bivalents chez une
plante diploïdisée fer- →
tile (Metaphase I)
(x 1000)



E. APTITUDE DES HAPLOÏDES A LA DIPLOÏDISATION

1°) Fragmentation

La transformation d'un haploïde en diploïde constitue l'étape la plus délicate de notre travail. Il faut d'abord préciser que les haploïdes sont un matériel trop précieux pour que l'on puisse se permettre d'en gaspiller, ne serait-ce que quelques unités. La prudence nous interdit donc de tenter aucun traitement sur un individu lorsqu'il est représenté dans notre collection par un exemplaire unique. C'est pourquoi nous faisons toujours précéder le doublement du génome de la fragmentation des plantes.

Chez une plante adulte diploïde, le rhizome de l'Asperge se présente comme une tige horizontale plus ou moins ramifiée (une étude détaillée du rhizome a été publiée par ROBBINS et JONES, 1928). Les bourgeons les plus jeunes sont groupés sur les rameaux, en massifs qui constituent autant de "pôles" reliés par des tissus plus âgés. On peut obtenir la fragmentation du rhizome en séparant au couteau les divers pôles. Deux précautions sont toutefois nécessaires :

- ne pas abimer les bourgeons,
- sauvegarder le système racinaire qui doit, lui aussi, être partagé en deux.

Les fragments ainsi obtenus peuvent être replantés immédiatement. La reprise est bonne lorsque la griffe originelle est saine et si les conditions de température et d'humidité sont favorables. Sur fragments de plantes jeunes, elle est meilleure que sur fragments de plantes âgées : ces dernières se prêtent mieux à la fragmentation en raison du nombre élevé de pôles qu'elles présentent mais la rhizogénèse y est moins rapide que chez les fragments jeune

fréquemment les fragments de plantes âgées effectuent aussitôt après leur séparation un départ en végétation remarquable : plusieurs bourgeons entrent simultanément en activité et produisent des turions sans qu'aucune racine nouvelle ne soit apparue. Les tiges vivent alors quelques semaines aux dépens des réserves de la griffe et des racines âgées, puis se flétrissent et meurent une fois ces réserves épuisées. Ce phénomène n'a jamais été observé avec des griffes âgées de 6 à 18 mois. La fragmentation des haploïdes suit exactement le même processus que celle des diploïdes. Elle ne peut commencer que lorsque la griffe est suffisamment développée pour que 2 ou plusieurs pôles se dessinent. Certains individus peuvent être fragmentés dès le 3ème mois. Pour d'autres, il faut attendre parfois 18 mois. Ces différences ne paraissent pas liées à une plus ou moins grande rapidité de croissance qui n'a d'incidence que sur la fréquence des fragmentations ultérieures, mais plutôt à la conformation des rhizomes dont il est certain qu'elle diffère avec le génome. Cette observation est également valable pour les diploïdes ; il paraît évident que, chez l'Asperge, les différences génomiques entraînent des différences d'aptitude à la fragmentation.

2°) Traitement diploïdisant à la colchicine

L'utilisation d'haploïdes pour l'obtention de lignées diploïdes homozygotes a été envisagée par de nombreux chercheurs mais peu d'entre eux l'ont réalisée.

A notre connaissance, des homozygotes diploïdes ont été obtenus essentiellement par doublement spontané : MORRISON (1933) en signale un cas sur Tomate, CHASE (1951) constate des doublements spontanés sur Maïs avec une fréquence de 10 % environ.

D'autres cas de doublements spontanés portant seulement sur des secteurs plus ou moins importants de la plante sont signalés chez Datura (SATINA et al., 1937).

Des cas de doublements provoqués par traitement (à la colchicine) sont signalés dans quelques genres: sur les deux espèces Gossypium hirsutum et Gossypium barbadense, BEASLEY (1940) obtient le passage sectorial de l'état haploïde à l'état diploïde dans 55 % des individus traités par immersion des bourgeons terminaux pendant 24 heures dans une solution aqueuse à 0,2 % de colchicine. Ces travaux ont été repris par ROUX et CHIRINIAN (1959) avec une technique un peu modifiée aboutissant sensiblement aux mêmes résultats.

Sur Asperge, aucun doublement d'haploïde n'a encore été réalisé et la mise au point de la méthode de diploïdisation a présenté de nombreuses difficultés.

Avec la méthode du traitement localisé à un secteur de rameau telle que l'applique BEASLEY (1940) sur Coton, il est nécessaire de traiter tout rameau en voie de floraison que l'on veut utiliser comme diploïde. La séparation des sexes chez l'Asperge ne permet pas comme chez le Coton, d'obtenir directement, à partir d'un unique rameau diploïdisé, une lignée reproductible par graine. Une telle lignée ne pourra en effet être créée qu'à la suite d'opérations génétiques multiples nécessitant l'utilisation répétée du matériel diploïdisé, ce qui explique que nous n'ayons pas cherché à obtenir la diploïdisation sectoriale mais plutôt celle d'individus entiers, définitivement diploïdes. On devrait pouvoir obtenir de tels individus en traitant soit des graines soit des griffes. Mais le traitement sur graines est exclu puisque nous ne connaissons de façon certaine le niveau de ploïdie des individus présumés haploïdes que lorsqu'ils sont déjà à l'état de plantules. Le doublement obtenu par traitement de griffe n'a de chances d'être général que si le produit mito-

clasique touche toutes les cellules au moment où elles sont en division, ce qui est fort peu probable, ou si les zones de tissu diploïdisé prennent, dès le début de leur croissance, le pas sur les tissus initiaux haploïdes dont nous ignorons a priori s'ils sont défavorisés par rapport aux diploïdes.

a) Essais préliminaire sur diploïdes

La technique de traitement n'a pu être mise au point directement sur des griffes haploïdes, trop rares pour être sacrifiées à des études préliminaires. Il est évident que des essais de traitement sur diploïdes ne peuvent pas fournir d'indications précises sur la technique la mieux adaptée au traitement des haploïdes. Ils peuvent cependant permettre de dégrossir le problème et d'établir les limites supérieures des concentrations en produit mitoclasique et des durées de leur application, étant admis que les haploïdes présentent sans doute une fragilité plus grande que les diploïdes, donc une plus grande sensibilité au traitement.

Le seul produit testé est la colchicine, déjà utilisée avec succès sur graines d'Asperge par BRAAK et ZEILINGA (1957) pour l'obtention de polyploïdes.

Un essai préliminaire a porté sur des plantes diploïdes âgées de deux mois et demi. Des lots de 8 griffes chacun sont complètement immergés, avec barbotage d'air pour éviter l'asphyxie, dans des solutions de colchicine à 4 concentrations différentes : 0,10 % - 0,25 % - 0,50 % - 1,00 % ; pour chaque concentration, 3 durées d'application : 1 heure - 6 heures - 24 heures. L'application est suivie d'un rinçage rapide à l'eau courante.

Les résultats groupés au tableau n° 5 n'ont pu être observés que quatre mois après le traitement. Jusque là les plantes, probablement ébranlées par le traitement n'avaient produit aucune nouvelle pousse.

Tableau 5

Application de colchicineEssai préliminaire sur plantes diploïdes

Durée du traitement \ Concentration en %	0,10	0,25	0,50	1,00
1 heure	8 diploïdes 0 tétraploïde 0 mort	8 diploïdes 0 tétraploïde 0 mort	5 diploïdes 3 tétraploïdes 0 mort	5 diploïdes 3 tétraploïdes 0 mort
6 heures	8 diploïdes 0 tétraploïde 0 mort	5 diploïdes 3 tétraploïdes 0 mort	2 diploïdes 6 tétraploïdes 0 mort	1 diploïde 6 tétraploïdes 1 mort
24 heures	3 diploïdes 0 tétraploïde 5 morts	5 diploïdes 3 tétraploïdes 0 mort	0 diploïde 2 tétraploïdes 6 morts	0 diploïde 2 tétraploïdes 6 morts

Il ressort de ce tableau que, dans les conditions de l'essai, les formules de traitement "6 heures à 0,5 %" et "6 heures à 1 %" paraissent donner la proportion la plus élevée de doublements.

b) Importance de l'état végétatif

A la suite de cet essai, les premiers traitements sur fragments d'haploïdes ont été entrepris. Dès le début, est apparue l'importance de l'état végétatif des fragments traités.

Le traitement d'un fragment fraîchement séparé de son homologue entraîne presque toujours sa perte. On peut supposer, pour expliquer la mortalité observée, que les blessures récentes de la griffes créent des zones plus sensibles à la toxicité du produit de traitement, ou que la reprise des griffes est entravée par les effets conjugués de deux traumatismes consécutifs : fragmentation et traitement. Quoiqu'il en soit, de meilleurs résultats sont obtenus si l'on attend la cicatrisation des blessures et l'apparition de nouvelles racines. Cette constatation est également valable pour les fragments de plantes diploïdes. L'âge des individus sur lesquels les fragments sont prélevés ne paraît pas avoir une incidence sur la réussite du traitement. Il faut toutefois signaler que nous n'avons traité que des fragments de plantes âgées au maximum de 2 ans. Il est donc impossible de connaître les réactions au même traitement de fragments de griffes plus âgées.

c) Immersion avec barbotage

Le contrôle du doublement du nombre de chromosomes est effectué lorsque de nouvelles tiges apparaissent, c'est-à-dire lorsque les bourgeons entrent à nouveau en activité après la période de sommeil qui suit toujours le traitement. On observe très souvent, dans la semaine qui suit le traitement, la

démarrage d'un ou de plusieurs bourgeons qui paraissent gonflés ou déformés et correspondent probablement à la multiplication désordonnée des cellules dans les apex qui présentaient lors du traitement le développement le plus avancé. Mais ce démarrage est rapidement stoppé et les pousses déformées se flétrissent. Dès lors, commence la période d'inaction dont la durée est le plus souvent de plusieurs mois. Pour contrôler la diploïdisation, nous prélevons le bourgeon terminal de l'une des tiges et effectuons le dénombrement des chromosomes par la technique de l'écrasement au Lackschwarz. Le prélèvement n'est considéré comme utilisable que si toutes les mitoses observées présentent le même niveau de ploïdie. Il arrive fréquemment que le méristème examiné soit mixoploïde, c'est-à-dire présente des cellules à n et des cellules à $2n$ chromosomes, parfois même des cellules à 4 ou $8n$. Dans ce cas, le prélèvement est considéré comme prématuré et un nouvel examen a lieu 1 ou 2 mois plus tard. Ainsi, 4 à 5 mois après avoir effectué divers traitements sur des fragments cicatrisés de plantes haploïdes, nos observations ont abouti aux résultats suivants :

Formule de traitement par barbotage		Nombre de fragments haploïdes traités	Nombre de fragments diploïdes obtenus	Nombre de morts
Concentration	Durée d'application			
0,50 %	6 heures	28	7	6
0,50 %	24 heures	9	3	4
0,75 %	6 heures	20	6	9
1,00 %	6 heures	6	2	1

On ne peut considérer que ces chiffres soient significativement différents. Les effectifs sont de toute façon insuffisants pour donner lieu à une interprétation mathématique. Sur les plantes diploïdisées, nous effectuons régulièrement des contrôles afin de nous assurer que l'état diploïde est général et non limité à quelques secteurs de la plante. Or, sur les diploïdes

obtenus, nous avons constaté, 6 mois plus tard, que les derniers rameaux poussés étaient haploïdes chez certains individus. Le doublement constaté lors du premier examen était donc sectorial et le tissu diploïde n'a pas éliminé le tissu resté haploïde. Au total, sur les 18 plantes considérées comme diploïdifiées, 4 seulement étaient restées complètement diploïdes. Chez 5 autres, un des pôles de la plante continuait à fournir des turions diploïdes, l'autre produisait des turions haploïdes. Les 9 autres plantes ne présentaient qu'un pôle, fournissant des turions haploïdes.

A la suite de cet échec partiel, nous avons dû envisager de modifier la technique d'application de la colchicine : pour augmenter les chances de toucher le plus grand nombre possible de cellules, il est nécessaire d'assurer une bonne pénétration du produit dans tous les tissus de la griffe, c'est-à-dire de procéder sous vide partiel pour éliminer l'air contenu dans les tissus et le remplacer par la solution de colchicine.

d) Immersion sous vide partiel

Un nouvel essai préliminaire sur fragments diploïdes a permis de mettre au point la technique de traitement sous dépression de 680 mm.

L'appareil utilisé est une étuve⁽¹⁾ à vide BREWER-HOULIER dans laquelle est placé le récipient contenant les griffes immergées dans la solution de colchicine. La dépression est établie et maintenue pendant quelques minutes pour assurer la sortie de l'air et la pénétration de la solution dans

(1) Bien que cet appareil offre des possibilités de chauffage, nous utilisons uniquement son aptitude à produire commodément une dépression contrôlée et travaillons toujours à température ambiante (~~#~~ 20°).

Une tentative de traitement à 30° a entraîné une mortalité très élevée.

les tissus ; puis la pression est rétablie lentement afin de ne pas détériorer les parois cellulaires ; le traitement peut ensuite être poursuivi sous barbotage à la pression atmosphérique.

Au cours des traitements effectués par la suite sur haploïdes, cette technique a subi diverses modifications visant à améliorer la proportion des doubléments obtenus et à diminuer la mortalité. Une attention particulière a été apportée au rinçage, qui doit assurer l'élimination totale de la colchicine dès que le temps imparti à l'application du produit est écoulé, les griffes sont rapidement rincées à l'eau courante, puis plongées dans l'eau et replacées dans l'étuve à vide où, sous la même dépression, la solution de colchicine est chassée des tissus et remplacée par l'eau ; le rinçage est ensuite complété à l'eau courante.

Nous n'entrerons pas dans le détail des 32 formules de traitement expérimentées. Deux techniques ont retenu notre attention :

Technique n° 1 : Dépression de 680 mm pendant 15 minutes dans une solution de colchicine à 0,5 %, suivie de barbotage jusqu'à la fin de la durée totale prévue pour l'immersion soit 4 heures. Passage rapide à l'eau courante. Rinçage pendant 15 minutes sous dépression de 680 mm puis pendant 1 heure à l'eau courante.

Technique n° 2 : Dépression de 680 mm pendant 30 minutes dans une solution de colchicine à 0,5 % - Pas de barbotage. Rinçage à l'eau courante pendant 2 heures sans intervention de vide.

Les résultats sont respectivement :

Technique n° 1	5 diploïdes et 17 morts sur 23 haploïdes traités
Technique n° 2	7 diploïdes et 13 morts sur 32 haploïdes traités.

Parmi les plantes considérées comme diploïdes au premier examen, quatre de chaque groupe sont restées, depuis 2 ans, entièrement diploïdes.

3°) Variabilité des résultats

Il faut se garder d'accorder à ces techniques plus de valeur qu'elles n'en ont. Elles ne sont signalées ici qu'à titre indicatif et appellent quelques commentaires :

a) Le même traitement produit des résultats différents selon le matériel auquel il est appliqué. Par exemple, la technique n° 1 a fourni lors de la première application 5 diploïdes et 7 morts pour 18 traités, lors de la deuxième application 0 diploïde et 10 morts sur 10 traités ; la technique n° 2 a fourni la première fois 3 diploïdes et 2 morts pour 7 traités, la deuxième fois 4 diploïdes et 11 morts pour 25 traités.

Il faut probablement voir dans ces variations une nouvelle manifestation de l'extrême hétérogénéité du matériel végétal sur lequel nous travaillons lorsque l'on traite des fragments d'haploïdes différents, donc porteurs de génomes différents, on observe des réactions individuelles différentes au même traitement. Par contre, nous avons pu constater, pour avoir traité à de nombreuses reprises, des fragments de la même plante haploïde, que les réactions, sans être identiques, sont plus comparables entre elles que celles de fragments d'haploïdes différents. En d'autres termes, il semble que les divers génomes représentés dans notre collection présentent des aptitudes différentes à la diploïdisation : l'un de nos plus vigoureux haploïdes, en particulier, quoique fragmenté et traité plus de 10 fois, n'est jamais passé à l'état diploïde ; les fragments meurent dans la plupart des cas (bien que des traitements plus doux

aient été essayés) ou ils restent haploïdes. On peut, dans ces conditions, se demander si certains génomes ne sont pas favorisés par l'état haploïde.

En dehors du rôle directement joué par le génome, il est probable que d'autres facteurs génétiques participent aussi, mais de manière indirecte, à l'irrégularité des résultats obtenus pour un même traitement : les fragments que nous utilisons après leur cicatrisation ne correspondent pas forcément à des portions de plante comparables ; la fragmentation est impérativement liée d'une part à la conformation de la griffe, d'autre part à la vigueur de la plante haploïde qui peut entraîner des différences entre la dimension des fragments le nombre et le développement des bourgeons portés par chacun. La conformation de la griffe et la vigueur de la plante sont, bien entendu, des caractères génétiques ; ils agissent indirectement et constituent au niveau des fragments isolés, des sources supplémentaires d'hétérogénéité.

Enfin, lorsqu'il s'agit de fragments prélevés sur une même plante, il ne peut y avoir identité complète entre eux lorsqu'ils sont prélevés en même temps (car ils correspondent en général à des rameaux du rhizome d'ordres différents et leurs bourgeons ne se trouvent pas au même stade de développement), ni lorsqu'ils sont prélevés à plusieurs mois d'écart car la plante haploïde a elle-même évolué entre-temps et d'autre part les conditions externes ont varié. Des facteurs internes plus ou moins liés au génome viennent donc renforcer les différences de réaction des divers fragments à un même traitement, ce qui explique la très grande variabilité constatée dans les résultats obtenus avec des traitements identiques.

b) Une solution de colchicine à une concentration donnée ne produit pas les mêmes résultats selon le produit commercial utilisé. Il paraît surprenant que les firmes commerciales ne livrent pas, sous la même dénomination

"colchicine pure" le même produit, mais nous avons ~~acquis~~ la certitude que des différences importantes existent entre les différentes colchicines disponibles sur le marché ; ces différences sont perceptibles dès la préparation des solutions qui n'ont ni la même couleur ni la même odeur. Elles deviennent évidentes avec l'application des solutions à des lots de griffes diploïdes utilisés à des tests préliminaires : selon le produit employé, on observe, avec le même traitement, des résultats très divers allant d'une très faible efficacité pour l'un des produits à une très grande toxicité pour un autre.

Il faut donc, si l'on veut diploïdiser des haploïdes, tester préalablement l'efficacité et la toxicité du produit dont on dispose et adapter la technique de traitement aux résultats de ces tests.

4°) Doublement du génome par irradiation

A la suite d'un essai d'irradiation de fragments haploïdes par les rayons γ , qui avait pour but l'induction de la mutagénèse chez ces plantes, nous avons constaté le doublement de 2 fragments portant le même génome. Pour cette première tentative de mutagénèse chez l'Asperge, effectuée au Centre d'Etudes Nucléaires de Cadarache, les conditions de l'irradiation avaient été établies arbitrairement en l'absence de tout renseignement concernant la susceptibilité des griffes aux rayons γ . L'essai, très limité, devait nous permettre d'apprécier grossièrement cette susceptibilité en vue d'irradiations ultérieures.

5 fragments, dont 2 portaient le même génome, ont été soumis respectivement aux traitements suivants : 350, 700, 1.000, 1.350, 2.000 rads.

Les résultats sont :

N° du génome et du fragment	Intensité de l'irradiation	Résultat
517 (G)	350 rads	diploïdisation
511 (L)	700 "	apparemment nul
351 E	1.000 "	mort
517 (H)	1.350 "	diploïdisation
264 (D)	2.000 "	apparemment nul

On se trouve donc en présence de deux mutations ayant produit des doublements du stock chromosomique. L'identité des deux mutations obtenues sur les deux fragments porteurs du même génome peut paraître surprenante mais elle est sans doute liée à l'aptitude particulière de ce génome au doublement : la plante haploïde 517 est également celle dont nous avons réussi le plus fréquemment à diploïdiser des fragments par application de colchicine.

Cette observation pourrait confirmer le caractère génétique de l'aptitude à la diploïdisation chez certains haploïdes. Toutefois, il faut signaler qu'au cours d'une deuxième expérience d'irradiation aux rayons γ , effectuée cette fois au Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay, sur 5 nouveaux fragments du même haploïde, deux ont été soumis à 400 rads, les trois autres à 800 rads et aucun doublement de génome n'a été obtenu. Tous les fragments sont restés haploïdes. Il n'y a pas eu de mortalité.

Nous n'avons pour l'instant constaté aucune trace de mutation apparente sur ces fragments.

5°) Bilan des diploïdisations obtenues

Parmi les 33 génomes haploïdes que nous avons conservés vivants, 2 n'ont pas encore pu être fragmentés. Les autres ont produit chacun un nombre de fragments allant de 2 à 15 et certains fragments ont eux-mêmes été de nouveau multipliés par division de la griffe, de sorte que nous avons pu traiter jusqu'

26 fragments de chacune des trois plantes haploïdes les plus aptes à la fragmentation.

Si l'on tient compte des délais écoulés entre deux fragmentations, de la gamme des formules de traitement essayés et du nombre de fragments soumis aux traitements, la fréquence de diploïdisation obtenue est relativement décevante puisque 15 génomes seulement ont pu être doublés sur 31 soumis aux traitements au cours de deux ans et demi de travail. Néanmoins, à l'exception de quelques cas de génomes présentant une stabilité qui paraît difficile à rompre, on peut espérer obtenir, à force de répéter les traitements, le doublement de la majorité des génomes représentés dans notre collection.

F. ASPECTS PHÉNOTYPIQUES DES INDIVIDUS DIPLOÏDISES

Nous avons dit plus haut que les individus diploïdes, qu'ils soient obtenues par traitement colchicinique ou par irradiation, ont des chances d'être homozygotes pour la quasi-totalité des loci puisque le doublement instantané du génome ne devrait pas laisser le temps à de nombreuses mutations de se produire. L'observation des plantes diploïdes obtenues peut donc nous éclairer sur les caractéristiques des individus proches de l'homozygotie totale chez une espèce généralement considérée comme hautement hétérozygote en raison de la séparation des sexes et de l'absence de sélection.

1°) Viabilité des diploïdes obtenus

A priori on peut penser que, lorsqu'un haploïde est viable, son génome ne comporte pas de gènes létaux ou défavorables. Le doublement du génome ne saurait donc entraîner l'élimination de l'individu diploïde obtenu. On constate en effet que ces plantes font preuve d'une viabilité satisfaisante.

Lorsqu'on transfère au champ des plantes quelconques d'asperge, jusque là élevées en serre, l'adaptation est souvent difficile et la plante ne paraît rétablir son équilibre avec le milieu extérieur que 2 ou 3 mois plus tard. Nous avons fait subir ce transfert à une dizaine de plantes diploïdisées. Leur adaptation n'a pas paru présenter plus de difficultés que pour les plantes hétérozygotes et 3 à 4 mois plus tard, leur végétation a été normale. Certaines de ces plantes ont fait preuve d'une très bonne vigueur.

Il faut par contre signaler que les diploïdes obtenus à partir d'haploïdes chétifs (dont nous possédons, nous l'avons dit, 3 exemplaires) sont eux-mêmes peu développés et ont des tiges grêles.

2°) Morphologie des diploïdes obtenus

La comparaison a été établie plus haut entre les haploïdes et leurs homologues diploïdes pour les caractères mesurables macroscopiques et microscopiques. Nous n'y reviendrons pas, si ce n'est pour en rappeler les résultats : le diploïde est toujours plus vigoureux que son homologue haploïde. Ses cladodes sont souvent plus longs. La mensuration des cellules de garde des stomates et des chloroplastes des cellules épidermiques du diploïde ne montre pas de différences significatives avec les mensurations correspondantes effectuées sur l'haploïde. Par contre, le dénombrement des chloroplastes dans les cellules de garde des stomates conduit à des résultats significativement différents entre haploïde et diploïde homologues, le nombre de chloroplastes étant toujours supérieur chez le diploïde (cf. graphiques).

En ce qui concerne les caractères non mesurables, il faut signaler que l'on retrouve dans tous les cas chez le diploïde l'aspect général observé chez l'haploïde, en particulier en ce qui concerne le port, la couleur des cladodes et l'aptitude à la fragmentation.

On voit se dessiner, grâce à ces observations, la possibilité de distinguer par la suite des aspects morphologiques caractéristiques de certains génomes, qui devraient permettre des études génétiques impossibles jusqu'ici.

3°) Aptitude à la reproduction

a) Maturité sexuelle

A priori, il est difficile de préciser à partir de quel moment une plante diploïdisée est en âge de se reproduire, faute d'une définition biologique précise de la notion d'âge elle-même : nous ignorons si un individu obtenu par doublement d'haploïde a commencé sa vie à proprement parler, lors du doublement du génome ou s'il a, d'emblée, l'âge du fragment haploïde dont il provient, c'est-à-dire l'âge de l'haploïde d'origine.

Cette question trouve sa réponse dans la présence de boutons floraux observée dans plusieurs cas sur les turions de plantes récemment diploïdisées.

Tout se passe donc comme si le diploïde avait, physiologiquement, l'âge de son homologue haploïde, et si l'induction de la floraison était déjà engagée à l'état haploïde (ce que confirme d'ailleurs l'apparition d'ébauches florales et parfois de fleurs signalée chez certains individus haploïdes).

b) Production de fleurs

A priori, on ignore aussi quel sera l'effet de l'homozygotie quasi totale, escomptée chez les diploïdes, sur la production d'organes sexuels.

En effet, si le fait qu'un haploïde a survécu implique l'absence dans son génome d'allèles défavorables à son développement végétatif, rien ne prouve par contre qu'il ne porte pas en lui un ou plusieurs allèles responsables de stérilité totale ou partielle. Sa propre fertilité, lorsqu'elle se

manifeste (comme nous l'avons signalée chez deux de nos haploïdes) ne peut être considérée comme un gage de fertilité pour le diploïde homologue car elle peut être liée à la suppression accidentelle ou génétique de la division I de la méiose, ce qui n'apporte aucun élément favorable pour la fertilité de son homologue diploïde.

Seule l'observation du comportement sexuel des plantes diploïdisées peut donc nous renseigner sur leur fertilité. Dans notre collection de plantes diploïdes, 15 génomes différents sont représentés chacun par plusieurs exemplaires. Il faut préciser ici la notion de "clone" diploïde, qui se substitue dès maintenant à celle d'individu diploïde : la multiplicité des exemplaires provient de ce qu'ils peuvent avoir deux origines : soit les fragmentations "post-doublement", soit les doublements "post-fragmentation". L'ensemble de tous les diploïdes provenant, par l'un ou l'autre processus, du même haploïde constitue un clone dont les éléments se comportent entre eux de façon comparable, avec cependant un certain décalage dans le temps, dû probablement aux différences de conditions internes propres à chaque fragment initial. Parmi les 15 clones diploïdes, 7 seulement ont, jusqu'ici produit des fleurs. Les autres, bien qu'assez âgés pour fleurir dans les conditions de la serre, n'en ont jamais produit.

La mise à fleurs paraît, chez certains clones, rencontrer quelque difficulté. On constate en effet sur quatre d'entre eux de nombreux avortements de boutons floraux à des stades plus ou moins avancés. La proportion de fleurs épanouies par rapport aux boutons initiés sur les jeunes rameaux paraît, selon les clones, se situer entre 5 et 50 %, c'est-à-dire au-dessous de la proportion observable chez des plantes quelconques en voie de floraison. Il se produit donc chez certains individus diploïdisés des phénomènes qui perturbent le développement des organes sexuels.

c) Sexe

Le sexe des individus diploïdisés doit être déterminé par le facteur "m" à l'état homozygote puisque ce facteur était présent chez les haploïdes correspondants. En l'absence du facteur M, les diploïdes ne doivent donc pas porter d'étamines fonctionnelles, ce que nous avons pu vérifier sur les 7 clones qui ont fleuri jusqu'ici. Tous ces clones sont femelles. Les fleurs sont de dimension normale et ne présentent en général aucune particularité sauf chez l'un des clones où elles ont un ovaire volumineux et un style très long de sorte que le stigmate émerge de la corolle.

d) Fertilité

La pollinisation par un pollen quelconque n'entraîne pas régulièrement la nouaison. Nous avons pu constater que, pour un clone donné, les premiers turions porteurs de boutons floraux présentent bien souvent une proportion élevée d'avortement et, lorsqu'ils fleurissent, une proportion élevée de fleurs stériles qui sèchent. Ceci ne présage rien quant à la fertilité à venir de la plante. Il semble que l'on ait affaire à des individus sexuellement trop jeunes pour franchir toutes les étapes de la reproduction. Les rameaux suivants font preuve d'une meilleure fertilité : peu à peu la mise à fruits se fait normalement.

Par contre, chez les clones dont 5 à 50 % seulement des boutons parviennent au stade de l'épanouissement, les accidents de nouaison se prolongent tout au long de la vie de la plante (du moins pour la période que nous en connaissons). A chaque floraison, une partie seulement des fleurs pollinisées donne des graines. Si l'on tient compte du faible pourcentage de boutons floraux arrivés au stade fleur, on se rend compte de la très faible fertilité que présentent finalement ces clones.

Dans notre matériel, sur 7 clones fleuris, nous observons que deux fleurissent abondamment de façon régulière et produisent des graines abondantes, un autre présente des floraisons rares mais est capable de donner une bonne proportion de fleurs fertiles et de graines, enfin quatre présentent des floraisons rares avec de forts pourcentages d'avortement au stade bouton floral et de stérilité au stade fleur, de sorte que les récoltes de graines sur ces plantes sont réduites à quelques unités à chaque floraison. En définitive, 2 clones seulement sur 7 présentent une fertilité équivalente à celle d'une bonne femelle d'origine quelconque. Il faut remarquer que ces deux clones sont précisément ceux qui ont été obtenus par doublement du génome des haploïdes les plus fertiles, dont la floraison est la plus couramment constatée et qui ont produit, l'un une graine, l'autre deux graines.

e) Etudes caryologiques

L'examen des méioses est toujours difficile chez une plante femelle en raison de l'avortement des étamines. Il est encore plus délicat lorsque l'on a affaire à une plante femelle dont la fertilité a été perturbée et dont le nombre de fleurs se trouve réduit. Quelques observations ont cependant pu être faites :

- Sur les clones fortement stériles qui présentent une proportion élevée d'avortement au stade bouton, on n'observe dans la plupart des cas aucune méiose, il semble bien que l'avortement dans les anthères se produise, dans ces cas, avant que le processus de la réduction chromatique ne soit amorcé. Chez ces mêmes clones, certains boutons présentent toutefois, dans leurs étamines, des cellules contenant des bivalents droits mêlés à des univalents.

- Ces cas d'asyndèse partielle sont par contre très fréquents chez les clones dont la fertilité est inférieure à 50 % ; l'ensemble des métaphases I

présente alors un aspect désordonné inhabituel (photo n° 10).

L'importance de l'asyndèse dans ces cellules pourrait être une conséquence des modifications apportées par l'état homozygote dans un système génétique initialement établi chez cette espèce pour fonctionner avec une fréquence élevée d'hétérozygotie (RILEY et LAW, 1965).

- Enfin, dans les boutons floraux des plantes les plus fertiles, les méioses dans les étamines paraissent en général se dérouler normalement, du moins en ce qui concerne la division réductionnelle : la plupart des métaphase I présente 10 bivalents droits (photo n° 11). Toutefois quelques cas d'asyndèse partielle sont encore observables dans des cellules mêlées aux cellules normales.

Il semble donc que, chez les plantes fertiles, les méioses perturbées au début ne se régularisent que progressivement. Ce phénomène n'est peut-être que la manifestation normale des difficultés constatées de façon générale chez tout organisme entrant dans une nouvelle phase de son évolution, manifestation qui se trouverait amplifiée chez les plantes déséquilibrées par leur récente diploïdisation.

Une étude plus détaillée des méioses chez les diploïdes obtenus à partir d'haploïdes sera poursuivie à mesure que de nouveaux clones fleuriront.

4°) Etude des descendances

La fertilité de quelques uns de nos clones permet d'en obtenir des descendants en croisement avec des géniteurs mâles quelconques, mais ne permet pas l'obtention de lignées présentant le même génome et reproductibles par la voie sexuée. Ces lignées présenteraient cependant un grand intérêt puisqu'elles devraient permettre l'élimination de la variabilité génétique et faciliter

ainsi l'étude des autres causes de variabilité à tous les stades de la vie de la plante. Pour les obtenir l'intervention d'un mâle portant, aux facteurs sexuels près, le même génome que le clone femelle est indispensable. Ce mâle "isogénique" ne peut être obtenu directement mais on peut en obtenir indirectement une forme approchée par la voie des rétrocroisements à femelle récurrente. Soit "D" un individu (femelle) obtenu par doublement du génome d'un haploïde "d". Croisons D par un mâle quelconque y. Parmi les descendants du croisement $D \times y$, prenons un mâle quelconque y_0 et réalisons le premier rétrocroisement $D \times y_0$. Dans la génération R_1 , issue de ce premier rétrocroisement, prenons un mâle quelconque y_1 et faisons le deuxième rétrocroisement $D \times y_1$, etc. En continuant ainsi à croiser toujours la même femelle initiale par un descendant mâle de chacune des générations, on diminue de moitié à chaque génération la fréquence des allèles d'origine paternelle dans la descendance. Au bout de 5 rétrocroisements, cette fréquence sera voisine de 1,5 %. A ce stade on peut considérer que l'isogénie du mâle et de la femelle est sensiblement acquise et que le sixième rétrocroisement donnera une descendance entièrement isogénique, elle aussi, de la femelle initiale, donc proche de l'homozygotie.

Nous avons commencé à réaliser cette suite de croisements sur les clones les plus fertiles. L'observation des générations successives nous a permis de constater que :

- pour l'un des clones

. en F_1 ,	on obtient	2	graines polyembryoniques	sur	180	plantes
. en R_1 ,	"	"	3	"	"	100
. en R_2 ,	"	"	3	"	"	40

- pour un autre clone dont la F_1 est constituée par un seul individu, la R_1 compte 5 graines polyembryoniques sur 51 plantes,

- pour un troisième clone, la F_1 compte 1 graine polyembryonique sur 6 plantes.

Bien qu'aucune interprétation statistique ne puisse être tirée de ces observations fragmentaires, il paraît évident que la fréquence de la polyembryonie dans une descendance augmente à mesure que la constitution génétique de celle-ci se rapproche de celle de la femelle initiale quand cette femelle a été obtenue par diploïdisation d'un haploïde isolé de graine gémellaire.

Il est possible qu'une fois en possession des lignées correspondant à nos haploïdes, nous puissions étudier l'hérédité de la tendance à la polyembryonie.

Il faut d'ailleurs rappeler que, chez d'autres espèces, des études analogues ont été rendues possibles par l'existence de diploïdisations spontanées ou provoquées.

En ce qui concerne la tendance à la production d'haploïdes, nous n'avons pu isoler aucun haploïde parmi les 14 plantes jumelles obtenues au total sur les différents clones.

Nous ne pouvons donc, en l'état actuel de nos connaissances, espérer une augmentation de la fréquence de l'haploïdie en orientant la prospection vers des descendance d'haploïdes.

G. RECHERCHE D'HAPLOÏDES PAR D'AUTRES METHODES

La nécessité de détenir de nombreux haploïdes d'origines variées nous entraîne à rechercher d'autres méthodes de prospection ou d'autres sources d'haploïdes.

1°) Utilisation d'un gène marqueur

L'éventualité du repérage des haploïdes par des caractères observables macroscopiquement n'a pas été évoquée jusqu'ici. Sur d'autres espèces, les haploïdes sont reconnaissables soit par leur aspect phénotypique général, par exemple chez Gossypium hirsutum, variété Upland, où ROUX et CHIRINIAN, (1959), signalent l'aspect caractéristique de la tige principale en "zig-zag" et des feuilles trilobées des haploïdes, soit par des caractères récessifs utilisés comme marqueurs par exemple l'absence de coloration rouge des plantules de Maïs utilisée par CHASE (1951).

Chez l'Asperge, nous avons vu que les caractères phénotypiques ne permettent pas de reconnaître un haploïde au sein d'une population diploïde hétérozygote. Par ailleurs, on n'y connaît pas de marqueur génétique satisfaisant.

Le sexe est probablement le caractère dont le déterminisme a été le plus étudié mais il est difficile de l'employer comme marqueur. RANDALL et RICK (1945) dans leur étude sur la polyembryonie, ont toutefois essayé de l'utiliser en conjonction avec un autre caractère mal connu mais dont les auteurs considèrent qu'il ségrège comme un facteur simple dominant : la coloration rouge anthocyanée de la base de la tige et des bractées dans les jeunes pousses.

En réalité, l'absence de coloration rouge chez une plantule d'Asperge n'est pas obligatoirement le fait d'un gène récessif présent à l'état homozygote : HEPLER et al. (1957), à l'occasion d'une étude sur la résistance à la rouille chez Asparagus officinalis ont isolé des mutants contrôlant la production du pigment anthocyanique, en particulier un gène dominant I^P inhibant la production d'anthocyane. Il est probable que RANDALL et RICK (1945) ont effectué leurs travaux sur une population où le gène n'~~existait~~ pas ; la valeur de leurs résultats ne saurait donc être mise en doute, mais l'existence, démontrée depuis, de ce type de gène nous interdit de considérer les plantules non anthocyanées d'Asperge comme obligatoirement homozygotes récessives pour le caractère anthocyané.

La coloration anthocyanée elle-même a été étudiée chez Asparagus officinalis par les méthodes chromatographiques par WANN et THOMPSON (1965). Ces auteurs distinguent, à l'oeil, 4 catégories de pigmentation faisant intervenir deux pigments : "cyanidine 3,5 diglucoside" et "cyanidine 3 monoglucoside", combinés différemment dans 3 catégories et absents dans la quatrième (non anthocyanée). Le caractère "couleur de la base des tiges et bractées" est donc complexe.

Une étude entreprise sur notre matériel a, par ailleurs, permis de constater la présence de 2 individus anthocyanés sur 86 descendants provenant de l'autofécondation contrôlée d'un bisexué non anthocyané. Ces observations mettent l'accent sur la difficulté qu'il y aurait à utiliser le caractère "non-coloration des plantules" pour la recherche des haploïdes parmi les graines issues de plantes non anthocyanées.

2°) Recherche d'haploïdes mâles

Le caractère constamment femelle des haploïdes obtenus jusqu'ici met en évidence l'intérêt que pourrait présenter une méthode de prospection permettant d'obtenir des haploïdes porteurs de l'élément M : la diploïdisation de tels individus fournirait des sujets MM capables de donner, en croisement avec une femelle diploïdisée à partir d'haploïde m, une descendance entièrement Mm, donc staminée, et homogène génétiquement.

La production d'haploïdes mâles peut se concevoir de deux manières :

- par polyembryonie chez les bisexués,
- par androgénèse.

a) La polyembryonie chez les bisexués

Etant admis que les plantes staminées portent toutes le facteur M, on peut s'attendre à ce que toute plante bisexuée soit Mm ou MM. Un haploïde qui se produirait par polyembryonie dans un individu Mm serait M avec une probabilité 0,5, et dans un individu MM serait forcément M.

Pour l'instant, nos recherches de graines polyembryoniques chez quelques individus bisexués n'ont permis d'en trouver que quelques dizaines. Un haploïde avait été isolé mais n'a pas vécu. Le travail se poursuit sur des effectifs plus nombreux.

A la suite de l'hypothèse de VALDEYRON (1967) sur l'origine de la bisexualité, on peut s'attendre à ce que tout haploïde descendant de bisexué et portant le gène M, porte en outre le récessif su et un certain nombre de récessifs de stérilité femelle, à moins qu'il n'ait été obtenu à partir d'un individu déjà sélectionné pour la bisexualité. La diploïdisation de tels indi-

dus et l'utilisation des diploïdes obtenus dans diverses formules de croisements pourraient constituer un moyen de confirmer ou d'infirmer les hypothèses concernant le déterminisme de la bisexualité.

b) L'androgénèse⁽¹⁾

Ce phénomène est très rarement observé. Biologiquement il est surprenant et difficilement explicable. Il rejoint peut-être l'observation de KONAR (1963) qui, à partir de pollen d'Ephedra foliata Boiss. cultivé in vitro, obtient successivement la formation du tube pollinique puis, dans 57 % des cas, la division des cellules haploïdes et le développement d'un tissu indéfiniment cultivable. L'entrée en division du noyau mâle incorporé dans le cytoplasme de l'oosphère peut être un phénomène comparable à celui que KONAR (1963) décrit in vitro. L'androgénèse a été signalée en 1929 par CLAUSEN et LAMMERTS et par KOSTOFF simultanément, à la suite d'un croisement interspécifique de Nicotiana et observée sur Antirrhinum majus L. (KIMBER et RILEY, 1963) et sur Crepis tectorum L. par GERASSIMOVA (1936) dans une fleur femelle irradiée, pollinisée par un pollen normal. Selon MAGOON et KHANNA (1963), des haploïdes androgéniques auraient aussi été signalés chez Hordeum bulbosum L. et Capsicum frutescens.

L'androgénèse paraît se produire spontanément chez le Maïs avec une fréquence de l'ordre de 5×10^{-6} (SEANEY, 1955) ou de 8×10^{-4} (CHASE, 1963). Le fait que les individus androgéniques portent le génome paternel et le cyto

(1) Androgénèse : développement d'une oosphère dont le noyau dégénère dès la fécondation de sorte que l'individu produit possède seulement les chromosomes paternels et est typiquement haploïde (KNIGHT, 1948).

plasme maternel les fait considérer par CHASE (1963) comme un matériel de transfert des caractères d'une lignée sur un cytoplasme mâle-stérile. Ils figurent avec une fréquence de 1 pour 80 parmi les haploïdes spontanés du Maïs et sont repérables par des gènes marqueurs responsables de couleurs différentes respectivement chez les plantules hybrides, haploïdes maternelles et haploïdes paternelles. Ces travaux ont été réalisés sur des lignées dont la fréquence d'haploïdie a été préalablement accrue par sélection.

Chez l'Asperge, nous ne disposons d'aucun gène marqueur caractérisé. Toutefois, le sexe pourrait, dans ce cas précis, être utilisé comme marqueur si l'on trouvait, dans une graine issue de plante femelle, un haploïde mâle, on pourrait supposer que cet individu aurait une origine androgénique. Pour l'instant, cette éventualité ne s'est pas présentée.

3°) Induction de l'haploïdie

a) Résultats obtenus avec les autres espèces

L'apparition d'haploïdes chez les espèces végétales n'est pas limitée aux cas de polyembryonie exposés plus haut ou aux rares cas d'androgénèse. Elle peut être obtenue artificiellement par stimulation de l'oosphère sans intervention de noyaux mâles de l'espèce. Les premiers haploïdes observés ont d'ailleurs été obtenus par des moyens artificiels par BELLING et BLAKESLEE (1923) qui avaient exposé au froid de jeunes bourgeons de Datura stramonium. Les techniques utilisées par la suite pour obtenir l'induction de l'haploïdie ont été très diverses. Les résultats ont rarement été positifs. Il faut citer parmi les moyens expérimentés avec quelque succès, les chocs thermiques, les applications de substances chimiques, les apports de pollen d'espèce éloignée du même genre, les apports tardifs de pollen et les irradiations.

- Les chocs thermiques ont été efficaces, dans des cas isolés, sur Maïs (BURNHAM, 1962)^{et}/Secale cereale L. (KIMBER et RILEY, 1963).

- L'application de substances chimiques ne donne de résultats nets que sur Maïs où l'application d'hydrazide maléique 24 heures avant la pollinisation fait passer le taux d'haploïdie de 2 à 7 %. (MAGOON et KHANNA, 1963). Les applications de colchicine se traduisent parfois par l'induction d'haploïdie mais il s'agit de cas isolés observés sur les genres Beta et Nicotiana (MAGOON et KHANNA, 1963) et sur Sorghum vulgare Pers. (ROSS et al., 1963).

- Les apports de pollen d'espèce éloignée ont été essayés sur de nombreux genres et ont produit des haploïdes, à notre connaissance, au moins sur 8 d'entre eux (IVANOV, 1938). Dans la plupart des cas, l'haploïde obtenu est une forme réduite du type maternel.

- Les apports tardifs de pollen (ou "pollinisations différées") paraissent être un moyen efficace pour induire l'haploïdie au moins chez deux espèces : chez Triticum monococcum, SMITH (1936) obtient une augmentation du taux d'haploïdie de 0,1 à 20 % en retardant de 12 jours la pollinisation. Chez le Maïs, SEANEY (1955), en différant de 20 jours la pollinisation, triple la fréquence d'haploïdie.

- Enfin, l'irradiation paraît avoir, plus que les autres procédés, retenu l'attention des chercheurs. IVANOV (1938) travaillant sur Nicotiana rustica, observe qu'en pollinisant cette espèce avec du pollen traité aux rayons X, le nombre de graines par capsule diminue à mesure que la dose d'irradiation augmente à partir de 8.000 rads, qu'il tombe à quelques unités par capsule à 23.000 rads et devient nul au-dessus. Entre 8.000 et 23.000 rads, le taux de germination des graines produites est bas. Au total IVANOV (1938) obtient 4 haploïdes sur 38 plantes, pollinisées avec du pollen irradié respec

tivement à 17.000 rads pour l'haploïde de la variété Humilis et 26.000 à 30.000 rads pour les trois haploïdes de la variété Texana.

D'autres auteurs ont également observé l'action des rayons X sur les organes sexuels ; MAGOON et KHANNA (1963) citent :

- . l'induction d'haploïdes chez Datura (BLAKESLEE, 1922) et Maïs (STADLER, 1931) par irradiation du pollen,

- . l'augmentation de fréquence des haploïdes de 0,48 à 17,58 % chez Triticum monococcum (KATAYAMA, 1934) par le même procédé,.

- . l'apparition isolée d'un rameau haploïde (haploïdie sectoriale) sur Citrullus par irradiation de graines (SWAMINATHAN et SINGH, 1958).

b) Résultats obtenus chez Asparagus officinalis

Les essais d'induction d'haploïdie que nous avons entrepris jusqu'ici ont porté essentiellement sur les traitements de pollen car les pollinisations différées sur Asperge sont très délicates en raison de la brièveté de la vie des fleurs femelles ; les chiffres du tableau n° 16 montrent qu'à partir du 4ème jour suivant l'épanouissement, la nouaison ne se produit plus dans les conditions de notre serre.

Notre attention s'est portée sur les applications de pollen traité par la chaleur et par les rayons γ .

- Pollen chauffé : Quatre lots de pollen provenant de quatre plantes mâles différentes sont soumis, en étuve, à une température constante de 60° pendant 3 heures, puis utilisés à polliniser diverses femelles. Au total, sur 161 fleurs pollinisées, 16 baies se sont formées, soit 25 graines dont 13 ont germé. Aucun haploïde n'a été observé. Les témoins avaient donné, sur un total de 64 fleurs pollinisées, 50 baies soit 202 graines germant à 90 % environ et 0 haploïde.

Tableau 6

Effets de pollinisations différées sur la production de graines

Délai d'apparition du pollen après l'épanouissement de la fleur femelle (en jours)	Nombre de fleurs pollinisées	Nombre de baies récoltées	Nombre de graines obtenues	Nombre d'haploïdes observés
0 (= témoin)	16	7	12	0
2	24	2	5	0
3	87	7	15	0
4	59	1	1	0
5	8	0	0	0

- Pollen irradié (rayons γ) : Le pollen d'une plante mâle connue a été soumis à 5 doses différentes de rayons γ , puis appliqué à 4 femelles différentes⁽¹⁾. Un nombre important de baies s'est formé, mais la plupart d'entre elles sont tombées rapidement. Sur l'ensemble des 4 femelles, on observe les résultats groupés dans le tableau n° 7.

L'obtention d'un haploïde à partir de l'unique graine germée obtenue sur 123 fleurs pollinisées par un pollen irradié à 25.000 rads est un fait remarquable : on constate qu'au-delà de la dose 25.000 rads, nous n'obtenons dans nos essais aucune graine germée. La dose 25.000 paraît donc être la limite supérieure de l'irradiation du pollen chez Asparagus officinalis, ce que confirme la proportion très faible de graines formées par rapport au nombre de fleurs pollinisées. Le fait que le seul embryon obtenu à cette dose soit haploïde laisse supposer que nous nous trouvons en présence de conditions particulièrement favorables à l'induction de l'haploïdie, à moins que la femelle pollinisée ne présente une aptitude particulière à la production d'haploïde sans intervention de polyembryonie.

L'expérience a été reprise à la dose 25.000 rads avec le pollen de la même plante et avec celui d'autres plantes. Les divers pollens ont été appliqués sur plusieurs femelles différentes au fur et à mesure des floraisons. L'essai est en cours. Comme dans le premier essai, de nombreuses baies se sont formées quelques jours après les pollinisations mais ces baies ne sont sans doute que la manifestation d'une stimulation probablement apportée aux ovaires par le pollen déposé sur le stigmate (VAN OVERBEEK et al., 1941). Au bout

(1) Si les essais n'étaient conduits que sur une plante femelle unique, les haploïdes qui pourraient éventuellement apparaître, pourraient être dus à une tendance particulière de cette plante à l'haploïdie.

Tableau 7

Induction de l'haploïdie par un pollen soumis
à diverses doses de rayons γ

Dose d'irradiation en rads	Nombre de fleurs pollinisées	Nombre de baies récoltées	Nombre de graines obtenues	Nombre de graines germées	Nombre d'haploïdes observés
Témoin (0)	97	61	250	51/60	0
1.300	103	70	207	27/60	0
8.000	128	55	151	123	0
15.000	77	49	55	7	0
25.000	128	9	3	1	1
50.000	126	1	0	0	0

d'une quinzaine de jours, les fruits jaunissent et tombent. Ils ne contiennent que des ovules desséchés. De très rares baies se maintiennent sur les diverses plantes femelles que nous avons pollinisées. Le tableau n° 8 est donné à titre indicatif ; les plantes, ayant fourni les divers pollens, y sont désignées par des numéros et les plantes femelles pollinisées, par des lettres. Dans chaque case, figure le nombre de fleurs pollinisées, suivi du nombre de baies qui se sont maintenues sur les plantes et sont en cours de maturation, donc susceptibles de contenir des graines (tableau n° 8).

De ces chiffres, on ne peut évidemment tirer aucun pronostic quant aux possibilités d'induction de nouveaux cas d'haploïdie par l'application de pollen irradié. Ces possibilités ne pourront être examinées qu'à maturité, par dénombrement des chromosomes dans les graines obtenues.

Les chiffres exposés permettent cependant de contrôler l'efficacité du traitement commun sur les divers pollens en s'assurant, par les faibles proportions de nouaisons obtenues, que les noyaux mâles ont été fortement modifiés par l'irradiation.

D'autre part, l'examen des nouaisons sur l'ensemble des femelles pour chacun des pollens soumis à 25.000 rads ne met pas en évidence de différences nettes entre les sensibilités des divers génomes à l'irradiation.

Si d'autres haploïdes apparaissent dans notre essai, nous pourrions considérer l'utilisation de pollen irradié comme une technique susceptible de permettre le choix des sources d'haploïdes : appliquée à des individus hétérozygotes porteurs de gènes remarquables, elle pourra constituer un moyen d'obtention d'individus homozygotes pour ces gènes.

Tableau 8

Fécondations obtenues avec divers pollens soumis à 25,000 rads (8)

Plante femelle pollinisée	Numéro de plante mâle dont le pollen a été irradié	1	2	3	4	5
A	64-5					
B	28-0					
C	12-4		13-0			11-0
D	24-0					
E	21-1					
F	137-0		112-2	105-1	85-1	30-1
G	37-0		54-0	44-1	47-2	24-0
H			49-0			
J			14-0			
K			21-4			
L				61-2	67-2	
M						48-3
Total pour l'ensemble des femelles		313-10	263-6	210-4	199-5	113-4

Chapitre IV

UTILISATION DES ETUDES CONCERNANT LA SEXUALITE ET L'HAPLOÏDIE

CHEZ L'ASPERGE POUR L'AMELIORATION AGRONOMIQUE DE L'ESPECE

Lorsque l'on entreprend une étude dans un but déterminé, il est encourageant de constater, par la suite, que l'objectif initial n'est pas le seul possible et que, par des rebondissements plus ou moins prévisibles, le travail entrepris trouve des utilisations complémentaires dans d'autres domaines.

En matière de biologie végétale, les recherches entreprises peuvent parfois trouver leur application en amélioration des plantes ; en particulier chez un matériel aussi mal connu et aussi peu amélioré que l'Asperge, tout complément d'information concernant la biologie de l'espèce doit permettre un progrès dans le sens de la sélection.

Nous examinerons ici quelques uns des aspects les plus évidents des possibilités d'utilisation de notre étude à l'amélioration de l'Asperge cultivée.

A. LA SEXUALITE

1°) Nous avons mentionné, à propos de la sexualité de l'espèce, que certains caractères quantitatifs se situent à des niveaux différents dans les deux sexes et, en particulier, que le rendement et la précocité sont généralement supérieurs chez les mâles.

L'intérêt que présenteraient des plantations entièrement composées d'individus mâles n'a pas échappé à SNEEP (1953) qui a entrepris la recherche de telles populations par des voies génétiques fondées sur l'existence du fac-

teur M à l'état homozygote chez une partie (un quart environ) des individus obtenus en autofécondant des bisexués. A la lumière des observations concernant la répartition des formes sexuelles parmi de telles descendance, et compte-tenu des origines possibles du caractère bisexué, on peut se demander dans quelle mesure des populations entièrement mâles peuvent être obtenues : il apparaît en effet que les populations entièrement staminées devraient être composées à la fois d'individus mâles et bisexués, ce qui réduirait beaucoup leur intérêt agronomique car les individus bisexués ne paraissent pas être des plantes productives ou précoces. Aucune étude chiffrée n'a pu être faite jusqu'ici car nous ne possédons un nombre important d'individus bisexués que depuis un an, mais l'aspect de leur appareil végétatif les situe au-dessous de la moyenne des individus d'une plantation normale. Il est important de savoir si cette moindre vigueur est obligatoirement liée à l'état bisexué ou si elle est le fait d'un hasard malheureux dans nos populations.

Au cas où une liaison génétique existerait entre les deux caractères, on pourrait en conclure que la recherche de populations entièrement staminées à partir de bisexués n'est pas souhaitable :

- d'une part parce qu'elle entraînerait obligatoirement l'existence de nombreux bisexués de faible vigueur en mélange avec les mâles obtenus ;
- d'autre part en raison des gènes de faiblesse qui existeraient forcément au départ dans le matériel initialement autofécondé et qui seraient susceptibles d'être plus ou moins transmis aux individus mâles eux-mêmes.

Au cas où aucune liaison n'existerait entre le caractère bisexué et l'absence de vigueur, on pourrait envisager de reprendre, avec un meilleur matériel de départ, la recherche de populations staminées.

Une meilleure connaissance du déterminisme de la sexualité devrait donc permettre de mieux utiliser la supériorité agronomique des individus mâles.

2°) Les mêmes renseignements ouvriront aussi la voie à une autre utilisation : la possibilité d'autoféconder les bisexués fait de ces individus un matériel remarquable chez une espèce dioïque. En effet, les lignées homozygotes présentent un certain intérêt en matière d'amélioration des plantes comme en matière de recherche génétique ; l'autofécondation de bisexués pendant plusieurs générations successives est, jusqu'à maintenant, la seule voie par laquelle quelques chercheurs aient tenté d'obtenir de telles lignées.

L'hérédité du caractère bisexué joue, dans ce procédé, un rôle capital puisqu'elle conditionne d'une part la possibilité d'effectuer plusieurs générations successives d'autofécondation, d'autre part la répartition des sexes au sein de la lignée homozygote qui pourrait éventuellement être obtenue (et du même coup sa valeur agronomique).

A ce double point de vue, la connaissance du déterminisme du caractère bisexué constitue un élément important pour la création de lignées pures utilisables à des fins agronomiques.

B. L'HAPLOÏDIE

La superposition chez l'Asperge des deux caractères : dioecie et pérennité constitue pour le sélectionneur une difficulté telle qu'elle suffit à expliquer le retard constaté dans l'amélioration d'Asparagus officinalis par rapport aux autres espèces cultivées.

La séparation des deux sexes, sauf dans le cas d'individus bisexués, exceptionnels dans les conditions naturelles, interdit l'autofécondation. La recherche de populations fixées ou de lignées pures destinées à la création d'hybrides F₁ ne peut donc selon les procédés classiques, être entreprise que

par la voie des croisements frère-soeur. S'il faut n autofécondations chez une espèce hermaphrodite pour atteindre un certain niveau d'homozygotie, il faut, pour atteindre le même niveau chez une espèce à sexes séparés, plus de $3n$ générations de croisements frère-soeur.

Chez l'Asperge, ce premier inconvénient, qui résulte de la dioécie, est aggravé du fait de la pérennité de l'espèce et de la longueur de son cycle de reproduction. Si l'on tient compte de la durée d'une génération (2 ans au minimum dans les conditions naturelles, ou 1 an en serre) et des délais nécessaires avant de pouvoir porter un jugement de valeur sur une plante ou sur une population (5 années s'écoulent entre le semis et la première "vraie"⁽¹⁾ récolte) on constate que l'obtention d'une population présentant un taux d'homozygotie élevé demanderait des délais très importants (par exemple, pour atteindre un niveau d'homozygotie de 94 % environ, équivalent à celui que l'on peut atteindre en 4 autofécondations chez une espèce monoïque, il faudrait plus de 13 ans en serre et plus de 26 ans dans les conditions extérieures si aucune sélection n'est pratiquée en cours de fixation, et beaucoup plus longtemps si des jugements doivent être portés sur les plantes dans le courant de ce travail. Dans ces conditions, l'emploi des croisements frère-soeur ne peut être sérieusement envisagé.

L'existence d'haploïdes est une solution possible au problème de l'obtention de lignées homozygotes. Le doublement du génome est utilisable, on l'a vu, et peut conduire à des individus diploïdes de bonne vigueur. Il faut cependant souligner que la création d'homozygotes par doublement d'haploïdes diffère

(1) Quelques cueillette sont effectuées la 4ème année mais elles ne permettent pas de porter un jugement sur la production à venir d'une population. La première "vraie récolte" commence en 5ème année et compte une quinzaine de cueillette.

fondamentalement des méthodes classiques (telles que le croisement frère-soeur par exemple) en ce sens qu'elle conduit instantanément à un matériel fixé homozygote (à quelques mutations près). Le travail de sélection ne peut donc intervenir qu'après la fixation.

La rareté des haploïdes, qui réduit les possibilités de choix du matériel de départ, et l'absence de toute sélection en cours de fixation constituent deux inconvénients de cette méthode.

Le sexe obligatoirement femelle des individus diploïdisés à partir d'haploïdes maternels constitue un troisième inconvénient, car il est nécessaire si l'on veut sélectionner des populations fixées, ou créer des hybrides F_1 , de disposer de matériel reproductible par semis et non d'individus isolés multipliables seulement par fragmentation.

L'obtention de lignées doit faire appel, nous l'avons vu, pour chaque génome provenant d'un haploïde initial, au mâle isogénique correspondant qui peut être obtenu par une série de rétrocroisements à parent femelle récurrent.

Le temps nécessaire pour chaque rétrocroisement correspond en principe au temps d'une génération, ce qui porterait à une dizaine d'années au moins les délais d'obtention d'un mâle homozygote à partir de la première floraison du diploïde femelle et rendrait cette technique difficilement utilisable. En réalité, la durée des générations de rétrocroisement est moindre, du fait que le parent femelle utilisé est constamment le même et que la production de pollen par les descendants mâles demande seulement 4 à 5 mois en serre.

D'autre part, une étude parallèle nous a permis de constater que l'on peut induire la floraison fonctionnelle de plantes mâles d'Asperge, un mois et demi après le semis, à condition d'accélérer la germination des graines en étuvant à 30° et de soumettre ces graines, dès le début de leur germination à l'alternance photo- et thermopériodique suivante : 8 heures de jour à $27-28^\circ$ + 16 heures

de nuit à 7-8°, jusqu'à l'apparition des fleurs qui se produit avec une fréquence d'environ 13 % (THEVENIN, 1967).

Dans ces conditions, on peut obtenir la descendance d'un rétrocroisement en 5 mois environ, ce qui rend possible, en moins de 4 ans, l'obtention du mâle recherché, porteur du génome du parent femelle récurrent, aux facteurs sexuels près. La création d'une lignée sensiblement homozygote est donc finalement possible dans des délais relativement courts dès que la diploïdisation d'un haploïde a été obtenue, sous réserve que le clone diploïde résultant du doublement soit apte à la reproduction.

L'utilisation de telles lignées ne présente d'intérêt en amélioration des plantes que dans la mesure où ces lignées permettent d'effectuer a posteriori un choix susceptible de compenser l'absence de sélection sur le matériel de départ. Sous réserve que le nombre d'haploïdes au départ soit élevé, la gamme de lignées sensiblement homozygotes dont nous disposerons sera assez étendue pour permettre d'une part l'élimination des lignées indésirables, d'autre part l'appréciation de celles qui présentent les meilleures valeurs hybrides.

Ainsi l'haploïdie peut être considérée, dans le cas de l'Asperge cultivée, comme un des rares moyens d'obtenir des lignées pures en vue de la création d'hybrides F_1 .

Enfin, l'obtention de lignées pures devrait nous permettre de disposer d'un matériel homogène et fixé sur lequel pourront être entreprises les recherches fondamentales concernant l'hérédité chez cette espèce, des facteurs responsables du rendement et des qualités technologiques, dont l'importance est capitale en amélioration des plantes.

RESUME ET CONCLUSIONS

L'Asperge, cultivée depuis fort longtemps est cependant mal connue. Cette espèce, réputée dioïque, est marquée par la superposition inhabituelle de certaines caractéristiques biologiques et génétiques : sa sexualité complexe, sa tendance à la polyembryonie et à l'haploïdie en font un matériel peu banal qui nous a paru digne d'attention en raison des possibilités qu'il offre dans divers domaines de recherche biologique.

Nos travaux, ralentis par la longueur du cycle végétatif de cette espèce pérenne et par le volume des individus adultes qui limite les possibilités de travail en serre, sont loin d'être terminés ; ils ont toutefois permis d'obtenir quelques renseignements concernant la sexualité, la polyembryonie et l'haploïdie.

A. LA SEXUALITE

1°) Polymorphisme floral

Une observation détaillée permet de constater le polymorphisme floral chez de nombreux individus considérés comme mâles et nous amène à considérer qu'il existe trois types de fleurs :

- Le type 1 semble porté exclusivement par des plantes dites femelles. Il présente un gynécée complet et des étamines avortées.

- Le type 2, à gynécée et androcée morphologiquement complets, peut être hermaphrodite ou femelle-stérile. Lorsque les fleurs sont hermaphrodites la plante se comporte elle-même en hermaphrodite. Lorsqu'elles sont femelle-stériles, elle se comporte en mâle.

- Le type 3 à androcée complet, est caractérisé par un gynécée morphologiquement plus ou moins incomplet. Les diverses formes de fleurs de ce type se rencontrent en mélange sur les mêmes plantes ; lorsque les fleurs sont toutes complètement femelle-stériles, la plante est mâle ; lorsqu'elles présentent une certaine fertilité femelle, qui peut d'ailleurs varier d'une année à l'autre et d'une fleur à l'autre, l'individu qui les porte se comporte en andromonoïque.

Les plantes femelles sont donc les seules qui puissent être nettement caractérisées. Les autres plantes sont toujours staminées. Elles sont mâles quand leurs fleurs sont femelle-stériles, hermaphrodites quand leurs fleurs sont morphologiquement et physiologiquement parfaites, andromonoïques quand leurs fleurs présentent une fertilité femelle partielle.

Les plantes andromonoïques produisent très peu de graines. Les hermaphrodites en produisent davantage. Les femelles en produisent en grand nombre.

2°) Déterminisme des formes sexuelles

L'existence d'individus bisexués à fleurs du type 2 ou 3 est constatée dans les populations avec une fréquence de l'ordre de 1 %. Ces plantes paraissent s'autoféconder dans les conditions naturelles. Leurs descendance s'égèren' selon le type : 3 staminés - 1 femelle, ce qui confirme l'hypothèse émise en 1943, d'un facteur génétique de déterminisme du sexe : selon cette hypothèse les femelles seraient mm, et les types Mm ou MM seraient mâles ou bisexués.

Parmi les plantes staminées descendant de bisexués autofécondés, la proportion de mâles et de bisexués est très variable selon les descendance examinées, ce qui laisse supposer un déterminisme complexe de ce caractère, influencé par ailleurs par les conditions de milieu.

3°) Hypothèses sur l'origine des bisexués

Diverses observations permettent de penser que l'Asperge dérive probablement d'un ancêtre bisexué MM par une mutation récessive m entraînant, à l'état homozygote, la stérilité mâle et une forte augmentation de la fertilité femelle. Cette mutation aurait été suivie de l'apparition d'un gène dominant Su lié à M et d'une série de récessifs r qui, à l'état homozygote, interviendraient comme Su, pour supprimer la fertilité femelle mais seraient hypostatiques par rapport à m. Les individus bisexués, présents en faible fréquence dans les populations, correspondraient aux phénotypes $[M su]$ résultant de crossing-over ; les descendance de ces bisexués par autofécondation, ségrègeraient différemment selon le nombre d'allèles r présents à l'état homozygote.

B. LA POLYEMBRYONIE

Etudiée en 1945 par RANDALL et RICK, la polyembryonie chez l'Asperge paraît se produire avec une fréquence d'environ 0,95 %, soit un peu plus souvent que chez les autres espèces où le taux moyen serait inférieur à 0,25 %. On peut distinguer quatre types de polyembryonie : nucellaire, par clivage, simple, complexe.

Le type complexe englobe, en particulier, le cas où il y a haploïdie de l'un des jumeaux, ou des deux. Ceci se produit, en moyenne, avec une fréquence de 0,5 % chez les autres espèces et de 1,8 à 2,0 % chez l'Asperge (d'après RANDALL et RICK, 1945).

Parmi les graines non polyembryoniques, il ne semble pas que l'on puisse obtenir le même taux d'haploïdes spontanés chez l'Asperge.

Chez les graines polyembryoniques, la compétition exercée entre jumeau entraînerait la disparition de certains embryons. Dans le cas de l'Asperge, l'embryon haploïde survivant ne devrait sa taille réduite qu'à son niveau de ploïdie qui constituerait ensuite un handicap dans la compétition avec le jumeau diploïde.

La tendance à la polyembryonie serait, en général, un caractère héréditaire complexe qui pourrait être accentué par sélection. Il en serait de même pour la tendance à l'haploïdie en général, mais aucune étude systématique sur Asperge n'a été faite pour ces deux derniers points.

La polyembryonie apparaît finalement comme une source possible d'individus spontanément polyploïdes ou haploïdes qui présentent un double intérêt :

- d'une part ils jouent un rôle important dans la diversification des espèces ;
- d'autre part, ils constituent un matériel appréciable pour l'étude de ces espèces.

C. L'HAPLOÏDIE

1°) Haploïdie obtenue à partir de graines polyembryoniques

La recherche des individus polyembryoniques chez des populations d'Asperge de type Argenteuil permet de constater la grande variabilité de leur fréquence selon les populations observées et de situer le taux moyen de polyembryonie réelle aux environs de 3 %, et celui de polyembryonie observée par germination à 2 % en moyenne. Ces chiffres sont nettement inférieurs à ceux proposés par RANDALL et RICK.

Les haploïdes, détectés par numération chromosomique dans les méristèmes radicaux d'embryons jumeaux, sont observés avec une fréquence relativement constante de l'ordre de 20 pour 1000 graines polyembryoniques (chiffre en accord avec celui de RANDALL et RICK, 1945), ce qui ramène le taux moyen d'haploïdie parmi les populations Argenteuil à environ 0,03 à 0,06 pour 1000 graines.

Nos recherches ont permis de rassembler une collection de 85 haploïdes qui a donné lieu aux observations suivantes :

- 75 proviennent d'une paire diploïde + haploïde
- 8 proviennent de 4 paires haploïde + haploïde
- 2 proviennent d'un triplet 1 diploïde + 2 haploïdes

- 33 haploïdes sur 85 ont survécu.

- Sur le plan morphologique, la comparaison entre plantes haploïdes et plantes diploïdes est à peu près impossible car les différences de constitution génomique sont telles, entre plantes, qu'elles peuvent masquer les différences imputables à leur état haploïde ou diploïde. De ce fait, certains haploïdes sont plus vigoureux que certains diploïdes portant d'autres génomes.

Par contre, pour un génome donné, l'état haploïde entraîne en général une réduction de l'ensemble de l'appareil végétatif.

- Les études microscopiques montrent que le dénombrement chromosomique est la seule méthode sûre pour rechercher et contrôler les individus haploïdes

- Sur 33 haploïdes vivants, 6 ont produit des fleurs toujours femelles, ce qui confirme l'hypothèse du déterminisme de l'état staminé par la présence du facteur M absent chez tout haploïde d'origine maternelle. Chez l'Asperge, les fleurs des plantes haploïdes ne sont fertiles que très exceptionnellement

Chez les plantes capables de produire des fleurs, l'étude des méiose n'est possible que dans les étamines en voie d'avortement. Nous avons pu y

observer 10 univalents répartis au hasard, en télophase I. Les étapes de la division II n'ont pas été vues. Les rares cas de fertilité femelle peuvent avoir diverses origines dont la plus probable est l'absence de division réductionnelle.

2°) Doublement du génome

- Certains haploïdes peuvent être complètement diploïdisés par action de la colchicine. La mise au point de ce traitement a été très délicate.

- Les résultats sont extrêmement variables selon le matériel soumis au traitement : il semble que les divers génomes présentent des aptitudes différentes à la diploïdisation avec, chez certains, une sorte de stabilité de l'état haploïde. D'autres facteurs internes, plus ou moins liés au génome renforcent encore les différences de réactions des fragments d'haploïdes différents à un même traitement.

- Le doublement du génome a pu aussi être obtenu sans application de colchicine par irradiation de fragments aux rayons γ .

- Aucun doublement spontané n'a été observé.

- Sur 31 haploïdes soumis aux traitements, 15 ont jusqu'ici pu être diploïdisés. Les divers fragments diploïdes obtenus à partir du même haploïde doivent être sensiblement homozygotes et sensiblement identiques entre eux. Ils constituent un clone. La viabilité de ces clones est bonne dans l'ensemble.

- Leur morphologie reproduit, à plus grande échelle celle de l'haploïde originel et les caractères qualitatifs paraissent se conserver lors du doublement du génome.

- Leur maturité sexuelle paraît liée à celle de l'haploïde et est acquise d'emblée lors de la diploïdisation si le fragment haploïde initial était sexuellement mûr. La production de fleurs n'intervient pas chez tous les

clones : on observe, d'un clone à l'autre, tous les stades intermédiaires de fertilité, depuis la non-production de boutons floraux jusqu'à la production abondante de fleurs femelles capables, après pollinisation, de donner des graines.

Les clones les plus fertiles correspondent aux haploïdes les plus aptes à produire des graines. Chez ces plantes, le début de la floraison est souvent accompagné d'une stérilité partielle des fleurs. Chez d'autres clones moins fertiles, une partie seulement des boutons floraux donne des fleurs et une partie seulement de ces fleurs peut produire des graines. L'étude des méios (dans les étamines en voie d'avortement) montre, dans ce cas, des métaphases I plus ou moins perturbées et pas de division II.

3°) Lignées homozygotes

Pour transformer un clone femelle fertile en lignée pure, l'intervention d'un mâle isogénique est indispensable. Ce mâle ne peut être obtenu que par une série de rétrocroisements à parent femelle récurrent. La succession des rétrocroisements permet de constater qu'à chaque génération, la proportion de polyembryonie augmente parmi les descendants au fur et à mesure que leur génome se rapproche de celui du parent femelle récurrent, ce qui tend à prouver que la tendance à la polyembryonie est bien un caractère héréditaire.

Nous n'avons pas, pour l'instant, constaté d'augmentation parallèle du taux d'haploïdie.

4°) Autres sources d'haploïdes

- L'obtention d'haploïdes plus nombreux est cependant souhaitable. L'utilisation de gènes marqueurs permettant le dépistage rapide des haploïdes dans les populations est impossible chez l'Asperge.

- La recherche d'haploïdes mâles parmi les graines polyembryoniques issues de bisexués n'a pour l'instant donné aucun résultat.

- Aucun cas d'androgénèse n'a pu être repéré.

- L'induction de l'haploïdie tentée par divers procédés a donné un résultat positif par utilisation de pollen irradié aux rayons γ sous une dose de 25.000 rads.

D. CONCLUSIONS

En définitive, l'étude entreprise sur l'Asperge cultivée, bien qu'elle soit très incomplète, apporte divers éléments nouveaux, dont l'utilité peut être envisagée sous deux aspects :

1°) Dans le domaine de la recherche biologique et génétique, le travail en cours permet de comprendre comment a pu s'établir le déterminisme du sexe chez l'Asperge et de considérer l'espèce comme dérivée d'un ancêtre bisexué, probablement de façon récente.

L'étude de l'haploïdie fournit des renseignements sur les fréquences de polyembryonie et d'haploïdie chez cette espèce, sur la viabilité, le phénotype et la fertilité des individus haploïdes et sur leur aptitude à la diploïdisation.

L'obtention, à partir d'haploïdes viables, de clones diploïdes permet d'atteindre un état voisin de l'homozygotie qui n'est jamais réalisé chez l'Asperge dans les conditions naturelles et dont nous ignorons, a priori, les effets sur la viabilité, le sexe, la morphologie et la fertilité des individus et sur l'homogénéité des populations qu'ils constituent : l'observation des individus sensiblement homozygotes obtenus à partir d'haploïdes nous permet d'être rensei-

gnés sur la plupart de ces points ; l'étude de leurs descendance éventuelles devrait permettre de préciser l'héritabilité des tendances à la polyembryonie et à l'haploïdie ; le matériel sensiblement homozygote qu'ils constituent représente, dans le domaine de la recherche génétique un outil de travail assez rare chez une espèce dioïque.

2°) Dans le domaine de l'amélioration de l'espèce, les études concernant la sexualité permettent une meilleure utilisation des individus bisexués et de la supériorité agronomique des plantes mâles.

Les haploïdes constituent, par ailleurs, le seul matériel de départ utilisable pour l'obtention de lignées fixées d'Asperge ; ces lignées permettent la création d'hybrides F_1 qui sont sans doute la formule d'avenir pour l'amélioration de l'espèce ; d'autre part, elles constituent un matériel de travail pratique pour l'étude de l'hérédité des caractères et du rôle joué par les facteurs du milieu, sur lesquels nous sommes pour l'instant fort mal renseignés.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BAKER J. G., 1875. Revision of the genera and species of Asparagaceae
J. of the Linnean Society Botany 14, 508-632
- BEASLEY J. O., 1940. The production of polyploids in Gossypium. J. Hered. 31,
39-48
- BELLING J. and BLAKESLEE A. F., 1923. The reduction division in haploid,
diploid, triploid and tetraploid Daturas. Proc. Nat. Acad.
Sci. 9, 106-111
- BELLING J. and BLAKESLEE A. F., 1927. The assortment of chromosomes in haploid
Daturas. La cellule 37, 355-361
- BERNINGER E., 1967. Communication personnelle
- BLAKESLEE A. F. & al., 1922. A haploid mutant in the jimson weed,
Datura stramonium, Science, N.S. 55, 646-647
(in MAGOON & KHANNA, 1963)
- BOZZINI A., 1959. Revisione cito-sistemica del genere Asparagus L. I = Le
specie di Asparagus della flora italiana e chiave analitica
per loro determinazione. Caryologia 12, 2, 199-263
- BOZZINI A., 1961. Ibridazione interspecifica e mutagenesi sperimentale nel
miglioramento genetico dell' asparago. Genetica Agraria 16,
212-218
- BRAAK J. B. and ZEILINGA A.E., 1957. Production of a colchicine-induced tetra-
ploid asparagus. Euphytica 6, 3, 201-213
- BREITENBACH W., 1878. Uber Asparagus officinalis L., eine triotische Pflanze
Bot. Zeitung, 36, 163-167
- BUCHHOLZ J.T., 1920. Embryo development and polyembryony in relation to the
phylogeny of conifers. Amer. J. Bot. 7, 125-145
(in WEBBER, 1940)
- BURNHAM C. R., 1962. Discussions in cytogenetics, Burgess (Minnesota) 375 p
- CAMPOS F.F. and MORGAN D. T. Jr., 1960. Genetic control of haploidy in
Capsicum frutescens L. following crosses with untreated and
X-ray pollen. Cytologia 25, 362-372
(in MAGOON & KHANNA 1963)
- CHAPMAN M., 1933. The ovule and embryo sac in Saxifraga virginensis.
Amer. J. Bot. 20, 151-158
(in WEBBER, 1940)

- CHASE S.S., 1949. Monoploid frequencies in a commercial double cross hybrid maize and its component single cross hybrids and inbred lines. Genetics 34, 328-332
- CHASE S. S., 1951. Corn monoploids. Maize Genetics Coop. News letter 25, 15
- CHASE S. S., 1963. Androgenesis. Its use for transfer of maize cytoplasm. J. Hered. 54, 152-158
- CHRISTENSEN H. M. and BAMFORD R., 1943. Haploids in twin seedlings of pepper Capsicum annuum L. J. Hered. 34, 98-104
- CLAUSEN R. E. and LAMMERTS W. E., 1929. Interspecific hybridization in Nicotiana X. Haploid and diploid merogony. Amer. Nat. 63, 279-282
(in IVANOV 1938)
- COE E. H. Jr., 1959. A line of maize with high haploid frequency. Amer. Nat. 28, (873), 381-382
(in MAGOON & KHANNA, 1963)
- COOPER D. C., 1943. Haploid-diploid twin embryos in Lilium and Nicotiana Amer. J. Bot. 30, 408-413
- CORRENS C., 1928. Bestimmung, Vererbung und Verteilung des Geschlechtes bei den höheren Pflanzen. Handb. Vererbungswissensch., 2, 1-138
(in FLORY, 1932)
- DARLINGTON C.D., 1965. Cytology 2nd edition (London) Churchill 768 p.
- DURAND B., 1963. Le complexe Mercurialis annua L. s. l. : une étude biosystématique. Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Vég. 12ème série, 4, 4, 579-736
- EMBERGER L., 1960. Les végétaux vasculaires (Paris). Masson et Cie 1540 p.
- ENDRIZZI J. E., 1966. Use of haploid in Gossypium barbadense as a source of aneuploids. Curr. Sci. 2, 34-35
- ENGELBERT V., 1941. The development of twin embryo sacs, embryos and endosperm in Poa arctica R. Br. Canad. J. Res. 19-5, 135-144
- ESSAD S. et TOUVIN H., 1959. Techniques de production et de contrôle des betteraves polyploïdes. Ann. Amél. Pl. 4, 553-574
- FERGUSON M. C., 1927. A cytological study of Petunia. Bull. Torrey Bot. Club 54, 657-664
(in van OVERBEEK al, 1941)
- FLORY W. S., 1932. Genetic and cytological investigation on Asparagus officinalis L. Genetics 17, 432-467

- FURUSATO K. and SHIMOTSUMA M., 1960. A preliminary note on sex expression and cytological observations in induced autopolyploid Asparagus officinalis L. Seiken Siho, 11, 38-42
- GAINES E. F. and AASE H. C., 1926. A haploid wheat plant. Amer. J. Bot. 13, 373-385
(in IVANOV, 1938)
- GERASSIMOVA H., 1936. Experimentell erhaltene haploide Pflanze von Crepis tectorum L. Planta 25, 696-702
(in MAGOON & KHANNA, 1963)
- GERSTEL D. U., and MISHANEC W. M., 1950. On the inheritance of apomixis in Parthenium argentatum. Bot. Gaz. 112, 96-106
(in MAGOON & KHANNA, 1963)
- GUSTAFSSON A., 1939. Auxin distribution in fruits and its significance in fruit development. Amer. J. Bot. 26, 189-194
- GUSTAFSSON A., 1947. Apomixis in higher plants. Lunds Univ. Arsskr. N. F. Afd. 2, 1-370
- HAYASE H. and KOMACHI S., 1951. Sexual differentiation of asparagus utilizing the degree of resistance to toxic action of potassium chlorate. Res. Bull. Hokkaido Agric. Exper. Stat., 66, 85-91
- HEPLER P. R. & al., 1957. Inheritance of resistance to asparagus rust. Univ. Illinois Bull. 607
- HOLLINGSHEAD L., 1930. A cytological study of haploid Crepis capillaris plants. Univ. Calif. Pub. Agr. Sci. 6, 107-134
- HUMPHREY L. M., 1934. The meiotic divisions of haploid, diploid and tetraploid tomatoes with special reference to prophase. Cytologia 5, 278-300
(in BURNHAM, 1962)
- HUNTER A. W. S., 1953. Chromosome numbers in twin plants of asparagus. Genetics and Cytology (Canada Dept. of agric. Hortic. Division Progr. Rep., 1949-1953), 22-23
- HUXLEY J., 1942. Evolution, the modern synthesis (London). Allen and Unwin 645 p.

- HUYSKES J.A. und SNEEP J., 1962. Spargel, Handbuch der Pflanzenzüchtung, 2 Auflage, 6, 131-148
- ISHII K., 1955. Cytological studies on some Asparagus I. Chromosome numbers and karyotype of some Asparagus., Nihon Univer., Bull. Coll. Agric. Veter. Sci. 4, 1-12
- ISHII K., 1957. Cytological studies on some Asparagus. 2. On the relation to some Asparagus plants from the stand point of karyotype. Nihon Univer., Bull. Coll. Agric. Veter. Sci. 7, 30-35
- IVANOV M. A., 1938. Experimental production of haploids in Nicotiana rustica L. and a discussion of haploidy in flowering plants. Genetica 20, 295-397
- JACOB F. and MONOD J., 1961. On the regulation of gene activity. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 26, 193-211
- JEFFREY E. C. and HAERTL E.J., 1939. Apomixis in Trillium. La Cellule 48, 77-88
(in WEBBER, 1940)
- JORGENSEN C.A., 1928. The experimental formation of heteroploid plants in the genus Solanum. J. Genetics 19, 133-211
(in van OVERBEEK & al. 1941)
- KAJALE L. B., 1938. Embryo and seed development in Nyctaginaceae, I. studies in the genus Boerhaavia. J. Ind. Bot. Soc. 17, 243-255
(in WEBBER, 1940)
- KAMO I., 1929. Einige Beobachtungen über die Chromosomen von Asparagus officinalis L. Bot. Mag., Tokyo 43, 127-133
- KAPPERT H., 1933. Erbliche Polymbryonie bei Linum usitatissimum. Biol. Zentralbl. 53, 276-307
- KATAYAMA Y., 1934. Haploid formation by X-rays on Triticum monococcum. Cytologia 5, 235-237
- KIHARA H., 1936. Ein diplo-haploides Zwillingspaar bei Triticum durum. Agr. & Hort. (Tokyo) 11, 1425-1433
(in COOPER, 1943)
- KIMBER G. and RILEY R., 1963. Haploid angiosperms. Bot. Rev. 29, 480-531
- KNIGHT R. L., 1948. Dictionary of genetics. Waltham, Mass. U.S.A. 183 p.
- KONAR R. N., 1963. A haploid tissue from the pollen of Ephedra foliata Boiss Phytomorphology 13-2, 170-174
- KOSTOFF D., 1929. An androgenic Nicotiana haploid. Ztschr. Zellforsch. u. Mikr. Anat. 9, 640-642
(in IVANOV, 1938)

- LESLEY M.M. and FROST H.B., 1928. Two extreme "small" Matthiola plants ; a haploid with one and a diploid with two additional chromosome fragments. Amer. Nat. 42, 22-33
(in IVANOV, 1938)
- LEWITSKY G. A., 1924. On the phenomena of abortion in the organs of reproduction of Asparagus officinalis L. Bull. Applied Bot., Lenin-grad 25, 113-142
- MAGOON M. L. and KHANNA K. R., 1963 . Haploids, Caryologia 16, 161-235
- MAHESHWARI P., 1945. Origin of haploid-diploid twin embryos in angiosperms Nature 156, 173-174
- MAHESHWARI P., 1950. An introduction to the embryology of angiosperms. (New York). Mc GRAW-HILL, 453 p.
- MALHOTRA R. C., 1930. The sex ratio in Asparagus officinalis L. and its artificial modification. J. Genet. 23, 157-172
- MORGAN D. and RAPPEYE R., 1954. A cytogenetic study of the origine of multiple seedlings of Capsicum frutescens. Amer. J. Bot. 41, 576-586
(in KIMBER & RILEY, 1963)
- MORRISON G., 1933. The occurrence and use of haploid plants in the tomato with special reference to the variety Marglobe. Proc. 6 th. Int. Genet. Congress 2, 137-139
(in MAGOON & KHANNA, 1963)
- MUNTZING A., 1937. Polyploidy from twin seedlings. Cytologia Fujii Jubl. Vol., 221-227
- NINAN C.A. and RAVEENDRANATH T. G., 1965. A naturally occurring haploid embryo in the coconut palm (Cocos nucifera L.) Caryologia 18-4, 619-623
- NORTON J. B., 1913. Methods used in breeding asparagus for rust resistance. U.S. Dept. Agric. B. Plant. Indust., Bull. 263, 1-60
- van OVERBEEK J. & al, 1941. Chemical stimulation of ovule development and its possible relation to parthenogenesis. Amer. J. Bot. 28, 647-656
- PEIRCE L. C. and CURRENCE T. M., 1962. The inheritance of hermaphroditism in Asparagus officinalis L. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 80, 368-376
- POCHARD E. Publication en cours

- RAMIAH K. & al., 1933. Haploid plant in rice (Oryza sativa). Curr. Sci. (Mysore) 1, 277-278
(in WEBBER, 1940)
- RANA R. S. 1966. Induced twinning in barley. J. hered. 57-6, 227-229
- RANDALL T. E. and RICK C. M., 1945. A cytogenetic study of polyembryony in Asparagus officinalis L. Amer. J. Bot., 32, 560-569
- REIMANN-PHILIPP R. & al., 1960. Cytologische Untersuchungen zur Identifizierung der Geschlechtschromosomen bei Asparagus officinalis L. in Verbindung mit der Züchtung rein männlicher Sorten, Z. Pflanz. Zücht. 42, 295-304
- RICK C. M. and HANNA G. C., 1943. Determination of sex in Asparagus officinalis L. Amer. J. Bot. 30, 711-714
- RILEY R. and LAW C. N., 1965. Genetic variation in chromosome pairing. Adv. Gen. 13, 57-114
- ROBBINS W. W. and JONES H. A., 1925. Secondary sex characters in Asparagus officinalis L. Hilgardia, 1, 183-202
- ROBBINS W. W. and JONES H. A., 1928. The asparagus industry in California. Univ. California Bull. 446
- ROSS J. G. & al., 1963. Colchicine-induced somatic chromosome reduction in sorghum. Proc. XI Int. Cong. Genet. 1, 120
- ROUX J. B., 1958. L'haploïdie chez le cotonnier. Cot. Fib. trop. 13, 289-292
- ROUX J. B. et CHIRINIAN G., 1959. Recherche d'haploïdes dans les variétés de cotonnier Upland (G. hirsutum). Cot. Fib. trop. 14, 357-362
- SATINA S. & al., 1937. Balanced and unbalanced haploids in Datura. J. Hered. 28, 193-202
- SEANEY R. R., 1955. Studies on monoploid in maize. Ph. D. Thesis, Cornell Univ.
(in BURNHAM, 1962)
- SHOJI T. and NAKAMURA T., 1928. On the dioecism of garden asparagus (A. officinalis L.). Jap. J. Bot. 4, 125-151
- SILOW R. A. and STEPHENS S. G., 1944. Twinning in cotton. J. Hered 35, 76-78
- SKOVSTED A., 1939. Cytological studies in twin plants. Comp. Rend. Lab. Carlsberg (Copenhagen) Ser. Phys. 22, 427-446
(in WEBBER, 1940)
- SMITH L., 1936. Cytogenetic studies in Triticum monococcum L. and T. aegiloploides Bal. Mo. Agr. Expt. St. Res. Bull. 248, 38
(in MAGOON & KHANNA, 1963)

- SNEEP J., 1953. The significance of andromonoecy for the breeding of Asparagus officinalis L. Euphytica 2, 89-95 et 224-228
- STADLER L. J., 1931. The experimental modification of heredity in crop plants I. Induced chromosomal irregularities. Sci. Agr. 11, 557-572.
(in MAGOON & KHANNA, 1963)
- SWAMINATHAN M. S. and SINGH M. P., 1958. X-ray induced somatic haploidy in water-melon. Curr. Sci. 27, 63-64
(in MAGOON & KHANNA, 1963)
- THEVENIN L., 1967. Les problèmes d'amélioration chez Asparagus officinalis L I Biologie et Amélioration. Ann. Amél. Pl. 17-1 (sous presse)
- THOMPSON A. E. and HEPLER P. R., 1956. A summary of resistance and susceptibility to Puccinia asparagi DC. within the genus Asparagus Plant Dis. Rep., 40, 2, 133-137.
- TIEDJENS V. A., 1925. Some physiological aspects of Asparagus officinalis L. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 21, 129-140
- TRAUB H.P., 1936. Artificial control of nucellar embryony in Citrus, Science 83, 165-166
(in WEBBER, 1940)
- VALDEYRON G., 1967. Sur le système génétique du figuier, Ficus carica L. Essai d'interprétation évolutive. Ann. Inst. Nat. Agron. (sous presse)
- VASILYEV B. I., 1936. A haploid plant of durum wheat, Triticum durum Desf. Trans. (Doklady) Acad. Sci., U.S.S.R. 1, 5, 243-244
(in IVANOV, 1938)
- VAZART B., 1959. Biologie florale de l'Asperge (Asparagus officinalis L.) Rev. Gén. Bot. 66, 405-418
- WANN E. V. and THOMPSON A. E., 1965. Anthocyanin pigments in asparagus. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 87, 270-273
- WEBBER J. M., 1940. Polyembryony. Bot. Rev. 6, 11, 575-598
- WESTERGAARD M., 1958. The mechanism of sex determination in dioecious flowering plants. Adv. Genetics 9, 217-281
- YAMAMOTO Y., 1936. Ein haplo-diploides Zwillingspaar bei Triticum vulgare Bot. Mag. (Tokyo) 50, 573
(in COOPER 1943)
- YARNELL S. H., 1954. Cytogenetics of the vegetable crops (Asparagus officinalis L. Var. Altilis L.). Bot. Rev. 20, 319-323

DEUXIEME THESE

PROPOSITIONS DONNEES PAR LA FACULTE

"LE DETERMINISME GENETIQUE DE L'APPARIEMENT MEIOTIQUE"
